

Superkomplexe aus Algen und Cyanobakterien

Isolierung, Charakterisierung und strukturelle Untersuchung

Zur Erlangung des akademischen Grades Doktor-Ingenieur (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation von Dipl.-Ing. Nicolas Georges Heidrich aus Pinneberg

Mai 2011 — Darmstadt — D 17



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

Fachbereich Chemie
AK Prof. Dr. N.A. Dencher

Superkomplexe aus Algen und Cyanobakterien
Isolierung, Charakterisierung und strukturelle Untersuchung

genehmigte Dissertation von Dipl.-Ing. Nicolas Georges Heidrich aus Pinneberg

1. Gutachten: Prof. Dr. Norbert A. Dencher
2. Gutachten: Prof. Dr. Peter Friedl

Tag der Einreichung: 12. April 2011

Tag der Prüfung: 24. Mai 2011

Darmstadt — D 17

*Meinen Eltern, meiner Schwester Muriel
und meiner Freundin Tanja*





„Ein Wissenschaftler benötigt vier Dinge: erstens einen Kopf zum Denken; zweitens Augen zum Sehen; drittens Geräte zum Messen; und viertens - Geld.“

Albert von Szent-Györgyi Nagyrápolt (1893–1986), amerikanischer Biochemiker
ungarischer Herkunft, 1937 Nobelpreis in Medizin





Die vorliegende Arbeit wurde am Clemens-Schöpf-Institut für Biochemie und Organische Chemie der Technischen Universität Darmstadt unter der Leitung von Prof. Dr. Norbert A. Dencher in der Zeit von Juli 2007 bis April 2011 erstellt.

Teile dieser Arbeit sind in Form von Tagungsbeiträgen bzw. einer Publikation veröffentlicht:

Poster

Nicolas G. Heidrich, Helena J. Schwassmann, Norbert A. Dencher, Holger Seelert
„Preparative elution of membrane protein complexes from gels for structural and functional characterisation“
VAAM-/GBM-Jahrestagung 2008, Frankfurt am Main.

Vortrag

Nicolas G. Heidrich
„Strukturaufklärung von mitochondrialen Proteinsuperkomplexen aus *Euglena gracilis*“
Doktorandenworkshop der Technischen Universität Darmstadt 2009, Darmstadt.

Veröffentlichung

T. Suhai, **N.G. Heidrich**, N.A. Dencher and H. Seelert, Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels, *Electrophoresis* **30**, 3622-3625 (2009).



Danksagung

Viele Menschen haben mich auf meinem Weg während des Studiums und der Promotion begleitet und unterstützt, und ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich hierfür zu bedanken.

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Norbert A. Dencher für die Annahme als Doktorand in seiner Arbeitsgruppe sowie für die Bereitstellung dieses spannenden Promotionsthemas bedanken. Die Betreuung in Form von fachlichen Diskussionen und Ratschlägen war stets sehr gut.

Herrn Prof. Dr. Peter Friedl danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Werner Kühlbrandt und seinen Mitarbeitern Bertram Daum sowie Dr. Eva Schäfer für die Durchführung elektronenmikroskopischer Aufnahmen. Ebenfalls möchte ich mich bei Herrn Dr. Sascha Rexroth für die massenspektrometrische Analyse meiner Proben bedanken.

Einen besonderen Dank spreche ich an Dr. Holger Seelert aus. Bei nahezu allen Problemen im Laboralltag stellte er immer mit seinem unglaublich umfangreichen Wissen eine enorm große Hilfe dar.

Christine Schröpfer, Elizabeth Trapp, Gerda Zeising und Michaela Fröhlich danke ich für die Unterstützung in vielerlei labortechnischer und administrativer Hinsicht.

Ganz besonders möchte ich mich bei Eva R. Schäfer, Sandra Thilmany und Monika Frenzel bedanken. Durch eure sehr liebe, menschliche und kollegiale Art wurde stets ein Arbeitsklima geschaffen, in dem ich mich jeden Tag mehr als wohl gefühlt habe und das wesentlich zur besseren Verknüpfung von Rückschlägen im Laboralltag beitrug. Vielen Dank für die wunderbare Zeit mit euch, die ich vermissen werde. Ebenfalls danke ich Manuela Kratochwil, Michael Muschol, Felix Bloeck, Michaela Söhn und Maria Saager für die gute Zusammenarbeit. Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Gastwissenschaftlern, ehemaligen Doktoranden und Diplomanden sowie allen nicht namentlich erwähnten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Physikalische Biochemie.

Mein Dank gilt ebenfalls Dr. Tim Vorfalt und Dr. Armin Brandner für die vielen fachlichen und privaten Diskussionen beim nahezu täglichen Frühstück in der Mensa.

Natürlich gilt der größte Dank meiner Familie. Meinen Eltern danke ich für die Ermöglichung dieses Studiums und die großartige Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Zusätzlich danke ich meiner Mutter für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Meiner Schwester Muriel möchte ich für die vielen motivierenden und aufbauenden Diskussionen danken. Abschließend danke ich besonders meiner Freundin Tanja. Deine Unterstützung und Motivation haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank dafür. Ich liebe dich.



Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	ix
Tabellenverzeichnis	xiii
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	5
2.1 Bioethanol und Biodiesel aus nachwachsenden Rohstoffen	5
2.2 Algen als nachwachsender Rohstoff	7
2.3 <i>Euglena gracilis</i>	10
2.4 <i>Astasia longa</i>	12
2.5 Ziele der Arbeit	13
3 Material	15
3.1 Chemikalien	15
3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
3.3 Software	21
4 Methoden	23
4.1 Kulturmedien und Anzucht der Organismen	23
4.1.1 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (<i>C. reinhardtii</i>)	23
4.1.2 <i>Euglena gracilis</i> (<i>E. gracilis</i>)	24
4.1.3 <i>Astasia longa</i> (<i>A. longa</i>)	24
4.1.4 <i>Nostoc muscorum</i> (<i>N. muscorum</i>)	25
4.1.5 <i>Cyanophora paradoxa</i> (<i>C. paradoxa</i>)	25
4.2 Aufschluss der Organismen und Isolierung der Thylakoide	25
4.2.1 <i>C. reinhardtii</i>	25
4.2.2 <i>E. gracilis</i>	27
4.2.3 <i>A. longa</i>	28
4.2.4 <i>N. muscorum</i>	28
4.2.5 <i>C. paradoxa</i>	29
4.3 Solubilisierung von Membranproteinen	30
4.3.1 Solubilisierung von Thylakoiden	33
4.4 Methoden der Dichtegradientenzentrifugation	34
4.4.1 Saccharose-Dichtegradienten	34

4.4.2	Percoll [®] -Dichtegradienten	35
4.4.2.1	Kontinuierlich gegossener Dichtegradient	36
4.4.2.2	Kontinuierlicher Dichtegradient per Zentrifugation	36
4.4.2.2.1	Thylakoidmembran-freie Isolierung von Mitochondrien	37
4.4.2.3	Percoll [®] -Stufengradienten	38
4.4.3	Optiprep [™] -Dichtegradienten	39
4.5	Probenvorbereitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen	40
4.5.1	Trennung und Entstapelung von Thylakoiden aus Chloroplasten	40
4.5.2	Lyse von Chloroplasten	41
4.6	Ermittlung von Proteinkonzentrationen	41
4.6.1	Proteinbestimmung mit Roti [®] Nanoquant	41
4.6.2	Proteinbestimmung mit Pyrogallolrot	42
4.7	Gelelektrophoretische Trennverfahren	43
4.7.1	Denaturierende Gelelektrophorese	44
4.7.2	Native Gelelektrophorese	45
4.7.2.1	Blau-native Gelelektrophorese (BN-PAGE)	47
4.7.2.1.1	Bis-Tris-BN-PAGE	48
4.7.2.1.2	Imidazol-BN-PAGE	48
4.7.2.2	Farblos-native Gelelektrophorese (CN-PAGE)	49
4.7.2.3	Hochauflösende farblos-native Gelelektrophorese (hrCN-PAGE)	50
4.7.2.4	Präparative Gelelektrophorese	50
4.7.2.5	Erhöhte Hydrophilie und Porendurchmesser in nativen Gelen	50
4.7.2.6	Proteinkonzentrierung mittels Y-förmigen nativen Gelen	51
4.7.3	Mehrdimensionale Gelelektrophorese	52
4.7.3.1	2D-SDS-PAGE	52
4.7.3.2	2D-SDS-PAGE nach Ahn	53
4.7.3.3	2D-BN-PAGE	54
4.7.3.4	3D-SDS-PAGE	54
4.7.4	Gelelektrophoretische Molmassenkalibrierung	54
4.7.5	Methoden zur Färbung von Gelen	55
4.7.5.1	Coomassie-Färbung	55
4.7.5.2	Silber-Färbung	56
4.7.5.3	Gegenionenfärbung	56
4.8	<i>In-Gel</i> -Aktivitätstests	58
4.8.1	Aktivitätstest für Komplex I	58
4.8.2	Aktivitätstest für Komplex II	59
4.8.3	Aktivitätstest für Komplex III	60
4.8.4	Aktivitätstest für Komplex IV	60
4.8.5	Aktivitätstest für Komplex V	61
4.8.6	Inhibierung von Enzymaktivitäten in nativen Gelen	62
4.9	<i>In-Lösung</i> -Aktivitätstests	63

4.10 Western-Blotting	64
4.10.1 Chemilumineszenz-Detektion	66
4.10.2 Detektion alkalischer Phosphatase	67
4.10.3 Verwendete Antikörper	68
4.10.4 Proteinstandard für Western-Blots	69
4.11 Elution von Protein(super)komplexen aus nativen PA-Gelen	69
4.11.1 Diffusionselution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen	69
4.11.2 Elektroelution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen	70
4.12 Fluoreszenzmarkierung von Proteinkomplexen	71
5 Ergebnisse und Diskussion	73
5.1 Anzucht und Aufschluss der Organismen	73
5.1.1 <i>C. reinhardtii</i>	73
5.1.2 <i>E. gracilis</i>	74
5.1.3 <i>A. longa</i>	75
5.1.4 <i>N. muscorum</i> und <i>C. paradoxa</i>	75
5.2 Solubilisierung von Thylakoidmembranen	76
5.2.1 Solubilisierung von Thylakoidmembranen aus <i>C. reinhardtii</i>	76
5.2.2 Solubilisierung von Thylakoidmembranen aus <i>E. gracilis</i>	77
5.2.3 Solubilisierung von Membranen aus <i>A. longa</i>	79
5.2.4 Solubilisierung von Membranen aus <i>C. paradoxa</i> und <i>N. muscorum</i>	81
5.2.4.1 <i>C. paradoxa</i>	81
5.2.4.2 <i>N. muscorum</i>	82
5.3 Dichtegradientenzentrifugation	84
5.3.1 Aufreinigung von Organellen	84
5.3.2 Aufreinigung von Proteingemischen	95
5.3.2.1 <i>C. reinhardtii</i>	95
5.3.2.2 <i>E. gracilis</i>	105
5.3.2.3 <i>N. muscorum</i>	110
5.4 Elution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen	113
5.4.1 Diffusionselution	114
5.4.2 Elektroelution	123
5.4.3 Elutionen aus DHEBA-quervernetzten PA-Gelen	131
5.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen	135
5.5.1 Cryo-Elektronen-Tomographie	135
5.5.2 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse an Superkomplexen	141
5.6 Charakterisierung von Proteinkomplexen aus verschiedenen Organismen	145
5.6.1 ATP-Synthasen	145
5.6.2 Mitochondriale Proteinkomplexe	158
5.6.2.1 ESI-MS/MS Untersuchungen von Superkomplexen aus <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien	163

5.6.2.2	<i>In-Lösung</i> -Aktivitätstests	164
5.6.2.3	Fluoreszenzmarkierung von Proteinkomplexen	166

Literaturverzeichnis	171
-----------------------------	------------

Abbildungsverzeichnis

2.1	Biodiesel-Herstellung	6
2.2	Bioethanol-Herstellung	7
2.3	Biowasserstoff-Bildung	9
2.4	Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>E. gracilis</i>	10
2.5	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von <i>E. gracilis</i>	11
2.6	Lichtmikroskopische Aufnahme von <i>A. longa</i>	12
4.1	Schematische Darstellung einer Solubilisierung	32
4.2	Strukturformel von Iodixanol	39
4.3	BSA-Standardreihe Nanoquant	42
4.4	BSA-Standardreihe Pyrogallolrot	43
4.5	Strukturformel von Pyrogallolrot	43
4.6	Schematische Darstellung zur Herstellung eines Gradientengels	47
4.7	Strukturformel von Coomassie G-250	47
4.8	Struktur eines mit DHEBA quervernetzten PA-Gels	51
4.9	Schematische Darstellung eines Y-förmigen Gels	52
4.10	Prinzip der 2D-SDS-PAGE	53
4.11	Strukturen von Ethylviolett und Zincon	57
4.12	Reduktion von NBT zu Formazan im Komplex-I-Test	59
4.13	Oxidation von DAB im Komplex-III-Aktivitätstest	60
4.14	Oxidation von DAB im Komplex-IV-Aktivitätstest	61
4.15	PbS-Fällung während der Hydrolysereaktion von Komplex V	62
4.16	Aufbau für einen Western-Blot in einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur	65
4.17	Chemilumineszenzreaktion durch HRP	67
4.18	Schema der Farbreaktion bei AP-Detektion	67
4.19	Schematischer Aufbau einer Elektroelutionszelle und -kammer	70
4.20	Reaktionsschema von NHS-Estern mit Aminen	71
5.1	Mini-BN-Gel solubilisierter Mitochondrien aus <i>C. reinhardtii</i>	76
5.2	Detergenstest mit Chloroplasten und Mitochondrien aus <i>E. gracilis</i>	78
5.3	Aktivitätstests mit Mitochondrien aus <i>E. gracilis</i> für verschiedene Detergenzien	79
5.4	Detergenstest mit Mitochondrien aus <i>A. longa</i>	80
5.5	Mini-BN-Gel solubilisierter Cyanellen von <i>C. paradoxa</i>	82
5.6	Mini-BN-Gele solubilisierter Thylakoide von <i>N. muscorum</i>	83
5.7	Percoll®-Gradient (10-80 %) eines Organellengemischs aus <i>C. reinhardtii</i>	85
5.8	Mini-BN-Gel mit Fraktionen 1–10 eines Percoll®-Gradienten	86

5.9	Per Zentrifugation generierter Percoll®-Gradient eines Organellengemischs aus <i>C. reinhardtii</i>	87
5.10	Mini-BN-Gel mit Fraktionen 1–8 eines Percoll®-Gradienten	88
5.11	Mini-BN-Gel und Western-Blot eines Mini-SDS-Gels mit gereinigten Mitochondrien aus <i>C. reinhardtii</i>	89
5.12	Optiprep™-Dichtegradienten	90
5.13	Mini-BN-Gel mit Fraktionen aus Optiprep™-Dichtegradientenzentrifugation	91
5.14	Mini-BN-Gele mit Fraktionen aus Optiprep™-Dichtegradientenzentrifugation nach Iodixanol-Entfernung	92
5.15	Vergleich von Absorptionsspektren	93
5.16	Western-Blot mit Fraktionen des Optiprep™-Dichtegradienten	94
5.17	Saccharosedichtegradienten solubilisierter Chloroplasten aus <i>C. reinhardtii</i>	95
5.18	BN-Gel mit per Saccharosedichtegradient fraktionierten Proteinen	96
5.19	2D-SDS-Ahn-Gele	97
5.20	Western-Blots von SDS-Gelen	98
5.21	Saccharosedichtegradienten solubilisierter Chloroplasten und Mitochondrien aus <i>C. reinhardtii</i> 15–55 %	99
5.22	BN-Gel der Chloroplastenfraktionen des Saccharosegradienten (15–55 %)	100
5.23	BN-Gel der Mitochondrienfraktionen des Saccharosegradienten (15–55 %)	101
5.24	BN-Gel mit Aktivitätstests der Mitochondrienfraktionen 5 und 6 des Saccharosegradienten (15–55 %)	102
5.25	2D-SDS-Gele der Mitochondrienfraktionen 5 und 6 des Saccharosegradienten (15–55 %)	103
5.26	2D-SDS-Gel des Mitochondriensolubilisates aus <i>C. reinhardtii</i>	104
5.27	Saccharosedichtegradienten solubilisierter Chloroplasten und Mitochondrien aus <i>E. gracilis</i>	105
5.28	BN-Gele fraktionierter Chloroplastenproteine aus <i>E. gracilis</i>	106
5.29	BN-Gele fraktionierter Mitochondrienproteine aus <i>E. gracilis</i>	107
5.30	Saccharose-Stufengradient solubilisierter Mitochondrien aus <i>E. gracilis</i>	108
5.31	BN-Gele der per Stufengradient gereinigten <i>E. gracilis</i> -Mitochondrienprobe	109
5.32	Saccharosedichtegradienten solubilisierter Thylakoide aus <i>N. muscorum</i> (15–55 %)110	
5.33	BN-Gele DDM-solubilisierter Dichtegradienten-Fraktionen aus <i>N. muscorum</i>	111
5.34	BN-Gele Digitonin-solubilisierter Dichtegradienten-Fraktionen aus <i>N. muscorum</i> .	112
5.35	Präparatives BN-Gel mit Mitochondrien-Solubilisat aus <i>C. reinhardtii</i>	114
5.36	Gelelektrophorese eines diffusionseluierten Proteinkomplexes aus <i>C. reinhardtii</i> .	115
5.37	Präparative CN-Gele mit Mitochondrien-Solubilisaten aus <i>C. reinhardtii</i> und <i>E. gracilis</i>	116
5.38	hrCN-PAGE eluierter Superkomplexe aus <i>C. reinhardtii</i> und <i>E. gracilis</i>	117
5.39	BN-PAGE eluierter Superkomplexe aus frisch isolierten und solubilisierten <i>C. reinhardtii</i> -Organellen	118
5.40	1,5 mm CN- und BN-Gel zur Elution von Proteinkomplexen aus <i>C. reinhardtii</i> . .	119

5.41	Konzentrierte <i>C. reinhardtii</i> -Superkomplex-Eluate aus 1,5 mm CN-Gelen	120
5.42	Konzentrierte <i>C. reinhardtii</i> -Protein(super)komplex-Eluate aus 1,5 mm BN-Gelen	121
5.43	Diffusionselution mit Lipidzusatz	121
5.44	Präparatives BN-Gel schmal mit solubilisierten <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien	123
5.45	Elektroeluiertes Superkomplex aus solubilisierten <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien	124
5.46	2D-SDS-PAGE elektroeluiertes Superkomplexe aus solubilisierten <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien	125
5.47	2D-BN-PAGE elektroeluiertes Superkomplexe aus solubilisierten <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien	126
5.48	BN-PAGE elektroeluiertes <i>E. gracilis</i> -Superkomplexe aus 4 mm präparativem BN-Gel	127
5.49	Präparatives CN-Gel mit solubilisierten <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien	128
5.50	BN-PAGE eines elektroeluierten <i>E. gracilis</i> -Superkomplexes aus einem präparativen CN-Gel	129
5.51	BN-PAGE eines elektroeluierten <i>E. gracilis</i> -Superkomplexes mit BHM-Solubilisierungspuffer	130
5.52	BN-DHEBA-Gele mit verschiedenen Konzentrationen an C	131
5.53	Referenzstreifen eines mit solubilisierten BHM beladenen präparativen CN-DHEBA-Gels	132
5.54	BN-PAGE Komplex-I-enthaltender Eluate aus CN-DHEBA-Gel	133
5.55	Präparatives BN-DHEBA-Gel mit <i>E. gracilis</i> -Mitochondrien-Solubilisat	134
5.56	BN-PAGE eines aus einem präparativen BN-DHEBA-Gel eluierten <i>E. gracilis</i> -Superkomplexes	134
5.57	SDS-Gel mit entstapelten Grana aus <i>E. gracilis</i> - und <i>C. reinhardtii</i> -Chloroplasten .	136
5.58	Western-Blot entstapelter Grana aus <i>E. gracilis</i> - und <i>C. reinhardtii</i> -Chloroplasten .	137
5.59	Cryo-Elektronen-Tomogramm der gestapelten Grana-Fraktion aus <i>C. reinhardtii</i> -Chloroplasten	139
5.60	Cryo-Elektronen-Tomogramm entstapelter Grana aus gereinigten <i>C. reinhardtii</i> -Chloroplasten	140
5.61	EM-Aufnahme eines diffusionseluierten Superkomplexes aus <i>C. reinhardtii</i>	141
5.62	EM-Aufnahme eines mit Lipiden diffusionseluierten Superkomplexes aus <i>C. reinhardtii</i>	142
5.63	EM-Aufnahme eines elektroeluierten Superkomplexes aus <i>C. reinhardtii</i>	142
5.64	EM-Aufnahme eines elektroeluierten Superkomplexes aus <i>E. gracilis</i>	143
5.65	EM-Aufnahme (mit anderen Kontrastmitteln) eines elektroeluierten Superkomplexes aus <i>E. gracilis</i>	144
5.66	2D-BN-Gel solubilisierter Chloroplasten aus <i>C. reinhardtii</i>	145
5.67	3D-SDS-PAGE ausgewählter Spots aus einem 2D-BN-Gel von solubilisierten <i>C. reinhardtii</i> -Chloroplasten	146
5.68	BN- und hrCN-PAGE solubilisierter <i>C. reinhardtii</i> -Mitochondrien	147

5.69 BN-PAGE solubilisierter <i>C. reinhardtii</i> -Organellen (photomixotroph und photoautotroph)	149
5.70 BN-PAGE solubilisierter <i>C. reinhardtii</i> -Organellen (photomixotroph)	149
5.71 2D-SDS-PAGE solubilisierter <i>C. reinhardtii</i> -Organellen (photomixotroph und photoautotroph)	150
5.72 BN-PAGE solubilisierter Organellen aus unterschiedlichen Organismen	151
5.73 Western-Blots solubilisierter Organellen aus unterschiedlichen Organismen	152
5.74 Western-Blots solubilisierter Organellen aus <i>C. reinhardtii</i> und <i>E. gracilis</i>	155
5.75 hrCN-PAGE solubilisierter Organellen aus unterschiedlichen Organismen	156
5.76 Western-Blots solubilisierter Organellen aus <i>C. reinhardtii</i> und <i>E. gracilis</i>	157
5.77 BN-Gel nach Komplex-I-Aktivitätstest für verschiedene Organismen	158
5.78 BN-Gel nach Komplex-IV-Aktivitätstest für verschiedene Organismen	159
5.79 Antikörpertest gegen Untereinheiten aus Komplex I und Komplex IV	161
5.80 Antikörpertest gegen eine Untereinheit aus AOX	161
5.81 Antikörpertest gegen eine Untereinheiten aus HSP70 und Prohibitin	162
5.82 <i>In-Lösung</i> -Komplex-I-Aktivitätstest mit BHM	165
5.83 Fluoreszenzmarkierung von BHM	167
5.84 Fluoreszenzmarkierung und Aktivitätstests von BHM	168

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
1D	erste Dimension, eindimensional
2D	zweite Dimension, zweidimensional
3D	dritte Dimension, dreidimensional
<i>A. longa</i>	<i>Astasia longa</i>
AOX	alternative Oxidase
AP	alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ASB-C8φ	4- <i>n</i> -Octylbenzoylamidopropyldimethylammonio-sulfobetain
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat, Dinatriumsalz
BHM	Bovine heart mitochondria, Rinderherzmitochondrien
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BMK-Puffer	Bicin-Magnesiumchlorid-Kaliumchlorid-Puffer
BN	blau-native
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
ca.	circa
CCMP	Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton
Chl <i>a</i>	Chlorophyll <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Chlorophyll <i>b</i>
CMC	Critical Micelle Concentration, kritische micellare Konzentration
CN	colourless-native, farblos-native
COX	Cytochrom-c-Oxidase, Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette
<i>C. paradoxa</i>	<i>Cyanophora paradoxa</i>
cpDNA	Chloroplasten-DNA
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
cw	cell wall deficient, Zellwand defizient
Cymal 5	5-Cyclohexyl-1-pentyl-β-D-maltosid
Cymal 6	6-Cyclohexyl-1-hexyl-β-D-maltosid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DDM	<i>n</i> -Dodecyl-β-D-maltosid
DDS	Dodecanoyl-D-saccharose
DHEBA	<i>N,N'</i> -(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid
DM	<i>n</i> -Decyl-β-D-maltopyranosid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natriumdesoxycholat
DS	Decanoyl-D-saccharose
DTT	1,4-Dithiothreitol
DY-V	<i>Dinobryon</i> -römisch fünf
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EE	Elektroeluat
<i>E. gracilis</i>	<i>Euglena gracilis</i>
EM	Elektronenmikroskopie
ESI-MS/MS	Elektrospray-Ionisations-Tandemmassenspektrometrie
g	Erdbeschleunigung ($1 \times g = 9,81 \text{ m s}^{-2}$)
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)piperazin- <i>N'</i> -(2-ethansulfonsäure)
hrCN	high-resolution colourless-native, hochauflösend farblos-native
HRP	Horseradish peroxidase, Meerrettich-Peroxidase
HS	High Salt
HSP	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
4-IPBA	4-Iodphenylboronic acid, 4-Iodphenylborsäure
kDa	kilo Dalton, $1 \text{ Dalton} \hat{=} 1 \text{ g mol}^{-1}$
LHCII	Light Harvesting Complex II, Lichtsammelkomplex II
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MFC	Microbial fuel cell, mikrobielle Brennstoffzelle
min	Minute
MOPS	3-(<i>N</i> -morpholino)propansulfonsäure
Mrd	Milliarde
<i>N. muscorum</i>	<i>Nostoc muscorum</i>
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenylylen) -bis-[2-(4-nitro-phenyl)-5-phenyl-2 <i>H</i> -tetrazoliumchlorid]
NC	Nitrocellulose
NCBI	Datenbank-Zugangsnummer des National Center for Biotechnology Information
NHS	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
NR	nachwachsende Rohstoffe
PA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PHB	Prohibitin
PIC	Protease-Inhibitor-Cocktail
PMSF	Phenylmethylsufonylfluorid
ppm	part per million, Verhältnisangabe Teile pro Million
PSI	Photosystem I
PSII	Photosystem II
ptDNA	Plastiden-DNA
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon, durchschnittliche Molmasse 40000 g mol^{-1}
RNA	Ribonukleinsäure
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase
RZB	relative Zentrifugalbeschleunigung, [$\times g$]
S1	Superkomplex 1 aus <i>C. reinhardtii</i> -Mitochondrien bestehend aus I ₁ III ₂ IV ₁
S2	Superkomplex 2 aus <i>C. reinhardtii</i> -Mitochondrien bestehend aus I ₁ III ₂ IV ₂

SAG	Sammlung von Algenkulturen Göttingen
SDS	Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
TAG	Triacylglyceride
TDOC	Natriumtaurodesoxycholat
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tricin	<i>N</i> -[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U min ⁻¹	Umdrehung pro Minute
UE	Untereinheit
ün	über Nacht
VF	Verdünnungsfaktor
(v/v)	volume per volume, Volumen pro Gesamtvolumen
(w/v)	weight per volume, Masse pro Gesamtvolumen
(w/w)	weight per weight, Masse pro Gesamtmasse
ZT	Zimmertemperatur



Tabellenverzeichnis

2.1 Vergleich der Genanzahl aus <i>E. gracilis</i> und <i>A. longa</i>	13
4.1 Mediumzusammensetzung für photoautotrophe Anzucht	23
4.2 Mediumzusammensetzung für photomixotrophe Anzucht	23
4.3 Hutner-Spurenelemente und Phosphatlösung	24
4.4 Medium nach Pringsheim und Wiessner	24
4.5 DY-V Medium	25
4.6 Aufschlusspuffer für <i>C. reinhardtii</i>	26
4.7 Waschpuffer und Aufschlusspuffer für <i>E. gracilis</i>	27
4.8 Resuspensions- und Aufschlusspuffer für <i>N. muscorum</i>	28
4.9 Wasch- und Lagerpuffer für <i>N. muscorum</i>	28
4.10 HEM- und Aufschlusspuffer für <i>C. paradoxa</i>	29
4.11 HEMS-Puffer und Schockpuffer für <i>C. paradoxa</i>	29
4.12 Liste gängiger Detergenzien	30
4.13 Solubilisierungspuffer-O (2x)	33
4.14 Beispielhafter Solubilisierungsansatz <i>C. reinhardtii</i>	34
4.15 Gradientenpuffer (4x)	35
4.16 Gradientenlösungen 15, 55 %	35
4.17 Percoll-Gradientenpuffer (5x)	36
4.18 Percoll-Gradientenpuffer (2x)	36
4.19 Puffer für Thylakoidmembran-freie Mitochondrienisolierung	37
4.20 Percoll-Stufengradient	38
4.21 Zusammensetzung der Medien für Optiprep-Dichtegradienten	39
4.22 Resuspensionspuffer zur Trennung von Grana- und Stromalamellen	41
4.23 Zusammensetzung des Lyse- und Minimalpuffers	41
4.24 Zusammensetzung der Lösungen für die Pyrogallolrotmethode	44
4.25 Pufferzusammensetzung für Glycin-SDS-Gele	45
4.26 Pipettierschema für vier kleine SDS-Gele	46
4.27 Abmessungen unterschiedlicher Gelgrößen	46
4.28 Pufferzusammensetzung für Bis-Tris-BN-Gele	48
4.29 Pipettierschema für vier kleine BN-Gele	49
4.30 Pufferzusammensetzung für Imidazol-BN-Gele	49
4.31 Pufferzusammensetzung für 2D-SDS-Gele	53
4.32 Pufferzusammensetzung und Pipettierschema für 2D-SDS-Ahn-Gele	54
4.33 LMW und HMW Proteinstandards	55
4.34 Zusammensetzung der Coomassie-Färbe- und -Entfärbelösung	56
4.35 Färbeprotokoll zur Silberfärbung	57

4.36 Zusammensetzung aller Lösungen für die Gegenionenfärbung	58
4.37 Zusammensetzung des Testpuffers für Komplex I	59
4.38 Zusammensetzung des Testpuffers für Komplex III	60
4.39 Zusammensetzung des Testpuffers für Komplex IV	61
4.40 Zusammensetzung des Testpuffers für Komplex V	62
4.41 Zusammensetzung des <i>In-Gel</i> -Inhibierungspuffers für Komplex I	63
4.42 Zusammensetzung des <i>In-Gel</i> -Inhibierungspuffers für Komplex IV	63
4.43 Stammlösungen für Komplex-I-Aktivität spektralphotometrisch	64
4.44 Substratlösung für Komplex-I-Aktivität photometrisch	65
4.45 Western-Blot Arbeitslösungen	65
4.46 Lösungen und Puffer für HRP-Detektion	66
4.47 Lösungen und Puffer für AP-Detektion	68
4.48 Verwendete Primärantikörper	68
4.49 Verwendete Sekundärantikörper	69
4.50 Zusammensetzung des Diffusionselutionspuffers	70
4.51 Zusammensetzung des Elektroelutionspuffers	71
4.52 Zusammensetzung des BMK-Puffers	72
 5.1 Präparationsübersicht von <i>C. reinhardtii</i>	 74
5.2 Präparationsübersicht von <i>E. gracilis</i>	75
5.3 Solubilisierungsansätze für <i>C. paradoxa</i>	81
5.4 Solubilisierungsansätze für <i>N. muscorum</i>	83
5.5 Solubilisierungspuffer (2x) für BHM	130
5.6 ESI-MS/MS Ergebnis des <i>E. gracilis</i> Superkomplexes S _{groß}	164

1 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen biochemische Charakterisierungen und strukturelle Analysen von Protein(super)komplexen aus verschiedenen pflanzlichen Organismen. Bei den untersuchten Organismen handelte es sich um die Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* und *Euglena gracilis*, die farblose Alge *Astasia longa*, das Cyanobakterium *Nostoc muscorum* sowie die Glaucophyte *Cyanophora paradoxa*. Die Kultivierung fand für *C. reinhardtii* unter photoautotrophen bzw. photomixotrophen Bedingungen statt. *C. reinhardtii* ist nämlich in der Lage mit Hilfe von Licht Kohlenstoff aus der Luft (CO₂) zu fixieren und diesen als Energiequelle zu nutzen (photoautotroph), kann aber zusätzlich auch Kohlenstoff aus Acetat, das dem Kulturmedium zugegeben wird, assimilieren (photomixotroph). Für alle anderen Organismen wurden keine Kultivierungsvariationen vorgenommen.

Für elektronenmikroskopische Untersuchungen, insbesondere für Einzelpartikelanalysen, sind sehr reine Proben in ausreichend hoher Konzentration essentiell. Vorbereitend auf diese strukturellen Analysen erfolgten zum einen Aufreinigungen von Organellengemischen, zum anderen Aufreinigungen von Proteingemischen. Zur Trennung von Chloroplasten und Mitochondrien wurden Dichtegradientenzentrifugationen mit Percoll[®] bzw. Optiprep[™] als Gradientenmedien durchgeführt. Die zur Aufreinigung von Organellengemischen eingesetzten Gradientenlösungen müssen chemisch inert sein und niedrige Osmolaritäten aufweisen, da andernfalls die Proben geschädigt werden. Beide Gradientenmedien erfüllen diese Anforderungen und es gelang Organellenmischungen aus *C. reinhardtii* zu trennen. Die erfolgreiche Trennung von Chloroplasten und Mitochondrien ging allerdings mit einem nicht unerheblichen Verlust an Protein einher, wie anschließende gelelektrophoretische Untersuchungen unter nativen Bedingungen zeigten (blau-nativ (BN)). Zur Aufreinigung von Proteingemischen wurden ebenfalls Dichtegradientenzentrifugationen durchgeführt. Als chemisch inertes Gradientenmedium wurde hier Saccharose eingesetzt, da es bei der Trennung von Proteingemischen nicht mehr erforderlich ist auf osmotische Effekte zu achten. Die BN-gelelektrophoretische Analyse der per Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Proteinfaktionen aus *C. reinhardtii*- und *E. gracilis*-Organellen bzw. *N. muscorum*-Thylakoiden zeigten den aufreinigenden Effekt dieser Methode. So konnten in Gradienten-Faktionen aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien das Tetramer der mitochondrialen ATP-Synthase und Komplex-I-enthaltende Superkomplexe angereichert werden. Für Gradienten-Faktionen aus *E. gracilis* wurde die Komigration eines mitochondrialen, Komplex-I-enthaltenden Superkomplexes und eines Proteinkomplexes des Photosyntheseapparates mit nahezu identischen apparenten Molekularmassen von je etwa 2000 kDa festgestellt. Die mittels Dichtegradientenzentrifugation erhaltenen Proben genügten nicht den hohen Reinheits-Anforderungen der elektronenmikroskopischen (EM) Untersuchungen. Im Vergleich zu den jeweiligen Solubilisaten erhielt man zwar Proben höherer Reinheit, Proteinkomplexe mit geringen Massenunterschieden ließen sich jedoch per Dichtegradientenzentrifugation nicht trennen. Auf Grund der hohen Trennleistung der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) ist

es möglich, aufgetrennte Proteinkomplexe aus einem nativen Gel auszuschneiden und diese per Elution zu isolieren. Auf diese Weise gelang es Proben zu erhalten, die sich in Bezug auf ihre Reinheit für EM-Analysen eigneten. Es konnte festgestellt werden, dass zur Isolierung von intakten Superkomplexen die Elektroelution aus BN-Gelen die Methode der Wahl darstellt. Entsprechende Elutionen aus farblos-nativen (CN) Gelen führten zum teilweisen Zerfall von Superkomplexen. Die Elution per Diffusion, welche gegenüber der elektrophoretisch durchgeführten Variante die eigentlich sanftere Methode darstellt, führte ebenfalls zur partiellen Dissoziation von Superkomplexen. Auch durch Zugabe von Digitonin zum Elutionspuffer während der Diffusionselution bzw. zum Eluat nach der Elektroelution konnten die entsprechend eluierten Superkomplexe nicht stabilisiert werden. Offensichtlich führt die Anlagerung des Farbstoffs Coomassie G-250 aus dem Kathodenpuffer an Superkomplexe zum einen zur erleichterten Elektroelution aus dem BN-Gel auf Grund der netto-negativen Ladung des Komplexes, zum anderen hat der Farbstoff gleichzeitig einen stabilisierenden Effekt auf das Eluat. Ein aus einem BN-Gel elektroeluiertes Superkomplex aus *E. gracilis* mit einer apparenten Molekularmasse von ca. 2000 kDa konnte elektronenmikroskopisch (EM durchgeführt von Dr. Eva Schäfer am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main) in mehreren Aufsichten und seitlichen Ansichten, bezogen auf die Sicht aus der Matrix- bzw. Membran-Ebene, abgebildet werden. In Bezug auf die Größe und die Form, ähnelt dieser pflanzliche Superkomplex der elektronenmikroskopischen Aufnahme des Superkomplexes $I_1III_2IV_1$ aus Rinderherzmitochondrien (BHM). Im Unterschied zum BHM-Superkomplex ist das auf Komplex I zurückzuführende, L-förmige Grundgerüst des *E. gracilis*-Superkomplexes mit deutlich voluminöseren, rundlichen Proteinkomplexen bestückt. Auf Grund von Hinweisen aus immunologischen Analysen mit Antikörpern gegen eine Untereinheit der alternativen Oxidase (AOX), positiven *In-Gel*-Aktivitätstests für Komplex I sowie massenspektrometrischen Nachweisen für das Vorhandensein des mitochondrialen Komplexes III in diesem *E. gracilis*-Superkomplex wurde dessen Zusammensetzung als $I_1III_2AOX_x$ postuliert. Für eluierte Superkomplexe aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien konnten im Elektronenmikroskop keine Proteinkomplexpartikel abgebildet werden.

Analog zu mitochondrialen ATP-Synthase-Dimeren, die vermutlich die Morphologie der Cristae gestalten, könnten ATP-Synthase-Dimere in Chloroplasten gekrümmte Strukturen in Thylakoiden induzieren. Zur näheren Überprüfung dieser Theorie wurden Thylakoidmembranen aus *C. reinhardtii*-Chloroplasten getrennt und gestapelte Grana entstapelt. Von den per Differentialzentrifugation erhaltenen gestapelten und entstapelten Thylakoidmembranen wurden am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt am Main von Bertram Daum im Elektronenmikroskop Tomogramme erstellt, d. h. es wurden verschiedene Ebenen innerhalb der Thylakoide inklusive der darin enthaltenen Proteinkomplexe abgebildet. Sowohl innerhalb von Stromalamellen als auch in entstapelten Membranbereichen konnte jeweils eine Vielzahl an ATP-Synthasen sichtbar gemacht werden. Hierbei handelte es sich allerdings immer um monomere Formen der CF_0F_1 . Auch in gekrümmten Übergangsbereichen zwischen Stromalamellen und gestapelten Grana wurden keine ATP-Synthase-Dimere gefunden.

Mit Hilfe von Antikörpern gegen die Untereinheiten α , β , ϵ , I, II, III und IV der Chloroplasten ATP-Synthase aus Spinat konnten in Organellen der Organismen *C. reinhardtii*, *E. gracilis*,

A. longa und *N. muscorum* unterschiedliche Formen von ATP-Synthasen nachgewiesen werden. Im Unterschied zu *C. reinhardtii* konnten allerdings für *E. gracilis* nur schwach, für *A. longa* und *N. muscorum* keine Banden für oligomeren Formen von ATP-Synthasen (Dimere, Tetramere) detektiert werden. Indirekte *In-Gel*-Aktivitätstests für Komplex V, bei denen die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i durch ATP-Synthasen sichtbar gemacht wird, bestätigten in vielen Punkten die Ergebnisse der immunologischen Analysen.

Zusätzlich zu ATP-Synthasen wurden in Mitochondrien aus *C. reinhardtii*, *E. gracilis* und *A. longa* weitere mitochondriale Proteinkomplexe festgestellt. Zur Charakterisierung dieser wurden immunologische Tests sowie *In-Gel*-Aktivitätstests eingesetzt. Auf diese Weise konnten in Mitochondrien aus *A. longa* Superkomplexe gefunden werden, die unter anderem die Atmungskettenkomplexe I und IV enthalten. Ebenfalls konnten nach Antikörperfärbungen solubilisierter Mitochondrien aus *C. reinhardtii*, *E. gracilis* und *A. longa* Banden für das Hitzeschockprotein HSP70 sowie das mitochondrienspezifische Protein Prohibitin detektiert werden.



2 Einleitung

Wir leben in einer hochtechnisierten Welt mit einem unfassbar hohen Bedarf an Energie. Im Jahre 2002 betrug dieser etwa 10^{21} kWh und wurde zum überwiegenden Teil (ca. 80 %) aus fossilen Energieträgern bereitgestellt^[1]. Trotz des Wissens um das begrenzte Vorkommen fossiler Brennstoffe wächst der Energiebedarf von Jahr zu Jahr weltweit. Damit einhergehend steigt die Konzentration des Treibhausgases CO₂ in der Atmosphäre seit Beginn der Industrialisierung im 18. Jahrhundert von etwa 280 ppm auf 380 ppm im Jahre 2005^[2,3]. Es ist deshalb dringend erforderlich, den Anteil an regenerativen Energien zu erhöhen und den weltweiten Ausstoß von CO₂ zu reduzieren.

2.1 Bioethanol und Biodiesel aus nachwachsenden Rohstoffen

Eine mögliche Maßnahme zur Reduzierung des CO₂-Ausstoßes ist die Verwendung nachwachsender Rohstoffe (NR). Hierbei handelt es sich um Rohstoffe, die aus Pflanzen gewonnen und zu Produkten wie Bioethanol oder Biodiesel weiterverarbeitet werden. Der Großteil des produzierten Bioethanols wird durch Fermentation von Stärke aus Mais bzw. Saccharose aus Zuckerrohr gewonnen^[4]. Hier ergibt sich das Problem, dass zum einen durch staatliche Förderprogramme die Bioethanol-Produktion aus Mais oder Zuckerrohr stark vorangetrieben wird, zum anderen aber die Preise für diese Rohstoffe ebenfalls ansteigen, weil diese plötzlich nicht mehr nur als Nahrungsmittel benötigt werden. Im schlimmsten Fall führt die staatlich geförderte Bioethanol-Produktion zum Abholzen von Regenwald, um neue Anbauflächen für beispielsweise Mais zu generieren^[4]. Außerdem ist es mehr als fraglich, ob Treibstoffe aus Lebensmitteln hergestellt und genutzt werden sollten, wenn gleichzeitig ein nicht unerheblicher Teil der Menschen auf der Erde hungert.

Eine ähnliche Problematik ist bei der Herstellung von Biodiesel zu beobachten. Hier nutzt man die in pflanzlicher Biomasse vorhandenen Öle, bei denen es sich im Wesentlichen um Triacylglyceride (TAG) handelt, also mit Glycerin veresterte Fettsäuren. Die Kettenlängen dieser Fettsäuren (C16–C18) ähneln denen in konventionellen Ölen fossilen Ursprungs^[4]. Durch Umesterung dieser TAG mit Methanol unter alkalischen Bedingungen erhält man Biodiesel, eine Mischung von Methylestern mit unterschiedlich langen Fettsäureketten. In Abbildung 2.1 ist die Umesterung eines Triacylglycerids zu Biodiesel schematisch dargestellt. Zur Produktion von Biodiesel eignen sich Pflanzen mit hohen Anteilen an Ölen. Die Ölpalme ist in dieser Hinsicht mit einer Ölausbeute von etwa 6000 L Öl ha⁻¹ Anbaufläche^[5] zweckmäßig. Allerdings hat sich in der Vergangenheit gezeigt, dass der Anbau von Ölpalmenplantagen nicht in nachhaltiger Weise geschieht. Zwischen 1990 und 2005 wurden in den Ländern Malaysia und Indonesien je ca. 60 % der Anbauflächen für Ölpalmen auf Kosten von Regenwald bereitgestellt^[6]. Dieser Verlust an Biodiversität durch die Errichtung von Monokulturen sowie die Zerstörung von Lebensraum für eine Vielzahl von Lebewesen stehen natürlich im krassen Gegensatz zum ökolo-

gischen Gedanken der Biodieselproduktion. Diese negativen Faktoren können durch den Einsatz von nachwachsenden Rohstoffen der zweiten Generation beseitigt werden. Statt Lebensmittel für die Bioethanol-Produktion zu fermentieren, nutzt man pflanzliche Abfälle beispielsweise aus der Agrar- und Forstwirtschaft. Diese Art der Biomasse liefert allerdings im Unterschied zu Mais und Zuckerrohr keine Stärke bzw. Saccharose direkt zur Fermentation, stellt aber trotzdem ein enormes hohes Potential zur Bioethanol-Produktion dar.

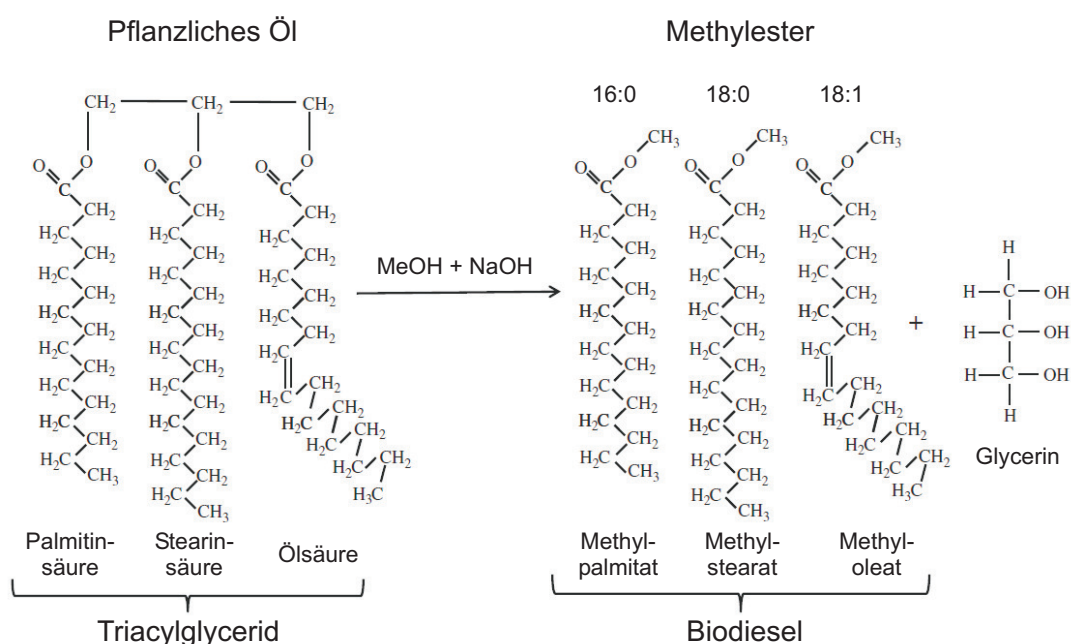


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Biodiesel-Herstellung. Mit Methanol erfolgt die Umes-terung eines Triacylglycerides im basischen pH-Bereich zu den jeweiligen Methylestern und Glycerin (modifiziert nach Sivakumar *et al.* 2010^[41]).

Der zu fermentierende Zucker dieser Biomasse steckt in den pflanzlichen Zellwänden, welche im Wesentlichen aus zwei Kompartimenten aufgebaut sind. Zum einen enthalten Pflanzen eine innere Zellwand, welche hauptsächlich aus Cellulose und Hemicellulose besteht, zum anderen eine äußere Zellwand. Diese besteht neben Cellulose und Hemicellulose noch aus poly-phenolischen Ligninen, welche für die Verholzung von Pflanzen sorgen^[4]. Die größte Herausforderung zur Bioethanol-Herstellung besteht nun in der Isolierung und enzymatischen Spaltung dieser Polysaccharide in die entsprechenden Zucker-Monomere. Die Vorbehandlung der Biomasse mit Ammoniak bei hohen Temperaturen führt zur Depolymerisierung von Ligninen und ermöglicht somit die enzymatische Spaltung von Polysacchariden^[7]. Eine kostengünstigere Variante stellt die Vorbehandlung der Biomasse mit verdünnten Säuren (z. B. Schwefelsäure 0,5–3 %ig) dar. Hierbei wird die äußere Zellwand durch den Abbau von Hemicellulose aufgelockert ohne Lignine zu beeinflussen. Dadurch erhöht sich die Ausbeute an Zuckern für die Fermentation^[8]. Zur Spaltung der isolierten Polysaccharide stehen mittlerweile viele Enzyme zur Verfügung. So werden zur Hydrolyse von Cellulose hauptsächlich die Enzyme β -Glucosidase, 1,4- β -D-Endoglucanase und 1,4- β -D-Cellobiohydrolase eingesetzt^[9]. Abschließend erfolgt die Fermentation der erhaltenen Zucker-Monomere zu Bioethanol. Hierbei ist zu bemerken, dass

die Fermentation der aus Hemicellulose erhaltenen Pentosen (z. B. Xylose und Arabinose) deutlich weniger effizient vonstatten geht als das bei Hexosen der Fall ist, sodass hier noch umfangreicher Forschungsbedarf besteht^[10]. In Abbildung 2.2 sind die einzelnen Schritte von der Biomasse bis hin zur Umsetzung zu Bioethanol schematisch dargestellt.

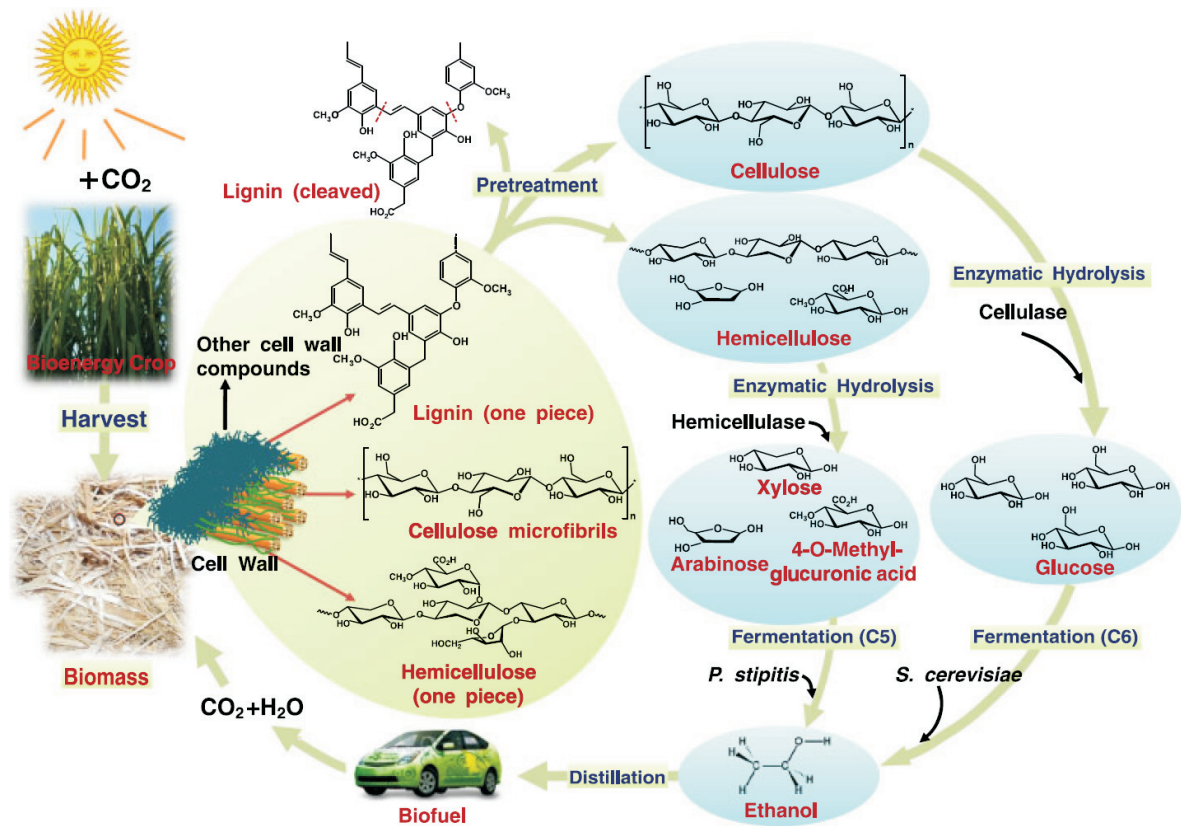


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Bioethanol-Herstellung aus agrar- und forstwirtschaftlichen Biomasse-Abfällen modifiziert nach Sivakumar *et al.* 2010^[4].

2.2 Algen als nachwachsender Rohstoff

Der Gedanke, Algen als nachwachsenden Rohstoff zu nutzen, ist nicht neu^[11]. Die immens steigenden Preise zur Energieproduktion aus fossilen Rohstoffen führen allerdings dazu, dass die einst zu teure Gewinnung von Rohstoffen aus Algen langsam konkurrenzfähig wird. In vielerlei Hinsicht eignen sich Algen als Rohstoffquelle. So liegt beispielsweise der photosynthetische Wirkungsgrad bei terrestrischen Pflanzen bei etwa 1 %, wohingegen Algen das Sonnenlicht bis zu fünfmal effizienter zur Biomasseproduktion nutzen. Ebenso von Vorteil ist das schnelle Wachstum von Algen, wodurch sie eine deutlich höhere flächenbezogene Produktivität aufweisen als Landpflanzen. Durch den vergleichsweise einfachen Aufbau von Algen steht deren gesamte Biomasse als Rohstoff zur Verfügung^[12]. Je nach Algenart können die unterschiedlichsten Produkte generiert werden. Bereits heute können Algen und Cyanobakterien (aufgeschlossenes Zellmaterial) zu Zwecken der Nahrungsergänzung käuflich erworben werden. Als Lieferanten von essentiellen Aminosäuren, Vitaminen, β -Carotin, mehrfach ungesättigten Fettsäuren (ω -3, ω -6)

und Mineralstoffen in verhältnismäßig hohen Konzentrationen werden Organismen wie *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina* und *Spirulina platensis* in der Lebensmittelindustrie eingesetzt. Rein auf die Biomasse bezogen wird mit Algen ein weltweiter Umsatz von etwa \$ 1,3 Mrd. erwirtschaftet^[12,13].

Gerade jedoch im Energiesektor scheinen die Möglichkeiten zur Nutzung von Algen immens zu sein. Vergleicht man die Ölausbeuten einiger Algen zur Herstellung von Biodiesel (70 % (w/w) Öl in Biomasse) mit der aus der Ölpalme, so erhält man mit diesen Algen eine mehr als 20fache Ausbeute an Ölen. Selbst Algen mit einem geringeren Ölanteil (30 % (w/w) Öl in Biomasse) übersteigen die Ausbeute im Vergleich zur Ölpalme um das 10fache^[14]. Auch zur Herstellung von Bioethanol können Algen verwendet werden. Die Ausbeuten an entsprechend zu hydrolysierenden Polysacchariden aus Algen sind zwar gering, bieten aber den Vorteil einer einfachen Gewinnung im Gegensatz zum kostenintensiven und aufwendigen Aufschluss von beispielsweise Lignocellulose bei Landpflanzen. An der Verwendung des β -D-(1→3)-Glucans Paramylon aus *Euglena gracilis* zur Bioethanol-Produktion wird aktuell geforscht^[12].

Eine weitere vielversprechende Alternative zur Stromerzeugung bietet die Verwendung von Algen in sogenannten mikrobiellen Brennstoffzellen (Microbial fuel cell (MFC)). MFCs bestehen aus einer Anode und einer Kathode, die räumlich voneinander durch eine Protonenaustauschmembran getrennt sind. Die Anode enthält Mikroorganismen, die die Zersetzung von Biomasse (z. B. Algen) in Elektronen und Protonen katalysieren. Durch die Reduktion von Sauerstoff an der Kathode wird Strom hergestellt. Mit *Chlorella vulgaris* als Substrat konnten bereits 2,5 kWh kg⁻¹ an Strom generiert werden. Die Stromdichten von etwa 1 W m⁻² sind zwar noch relativ gering, werden aber in Zukunft durch Weiterentwicklungen sicherlich gesteigert^[15,16].

In diesem Zusammenhang sind auch Brennstoffzellen denkbar, die mit Algen betrieben werden, aber nicht als Substrat fungieren sondern selbst Wasserstoff (H₂) produzieren und somit Strom erzeugen. *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine solche Alge, die zur Wasserstoff-Produktion befähigt ist. Durch Lichtabsorption von Photosystem II (PSII) wird die Oxidation von Wasser zu Sauerstoff (O₂) und Protonen katalysiert. Die hierbei erhaltenen Elektronen werden über eine Elektronentransportkette auf Plastocyanin übertragen. Von hier werden durch Lichtabsorption von Photosystem I (PSI) die Elektronen zu Ferredoxin (FDX) weitergeleitet. In *Chlamydomonas reinhardtii* überträgt die oxidierte Form des Ferredoxins die Elektronen auf die hieran gebundene [Fe]-Hydrogenase (H₂ase), welche zusammen mit Protonen die Bildung von H₂ katalysiert. Diese H₂-Produktion kann allerdings nur über einen kurzen Zeitraum (30 – 90 s) geschehen, da der photosynthetisch gebildete Sauerstoff die [Fe]-Hydrogenase inhibiert. Alternativ zu PSII können Elektronen auch aus der Glykolyse über eine NAD(P)H-Plastochinon-Oxidoreduktase auf Plastochinon und von dort über Plastocyanin, PSI und Ferredoxin auf die [Fe]-Hydrogenase übertragen werden, wo schließlich H₂ generiert wird. Trotzdem bleibt das Problem der Inhibition der [Fe]-Hydrogenase durch Sauerstoff weiterhin bestehen. Abbildung 2.3 stellt die einzelnen Reaktionswege zur H₂-Bildung schematisch dar.

Um die H₂-Produktion über einen deutlich längeren Zeitraum aufrecht zu erhalten und somit wirtschaftlich zu machen, wird die O₂- und H₂-Bildung über zwei Stufen temporär voneinander entkoppelt. In der ersten Stufe erfolgt die Anzucht von *Chlamydomonas reinhardtii* unter nor-

malen photosynthetischen Bedingungen. In der zweiten Stufe werden die Algen ohne Sulfat im Anzuchtmedium kultiviert. Dies hat zur Folge, dass die *de novo* Biosynthese von photo-oxidativ geschädigten Untereinheiten aus PSII inhibiert wird und sich somit die Bildung von O₂ reduziert. Gleichzeitig bleibt durch den Sulfat-Entzug die Respiration in Mitochondrien unbeeinflusst und die Bildung von H₂ kann auf einen Zeitraum von mehreren Tagen ausgedehnt werden^[17]. Auf der Grundlage dieser umfangreichen Forschungsarbeiten bezüglich der Stoffwechselwege in *Chlamydomonas reinhardtii* kann durch genetische Modifikationen zukünftig die Produktion von Biowasserstoff gesteigert und damit wirtschaftlich werden.

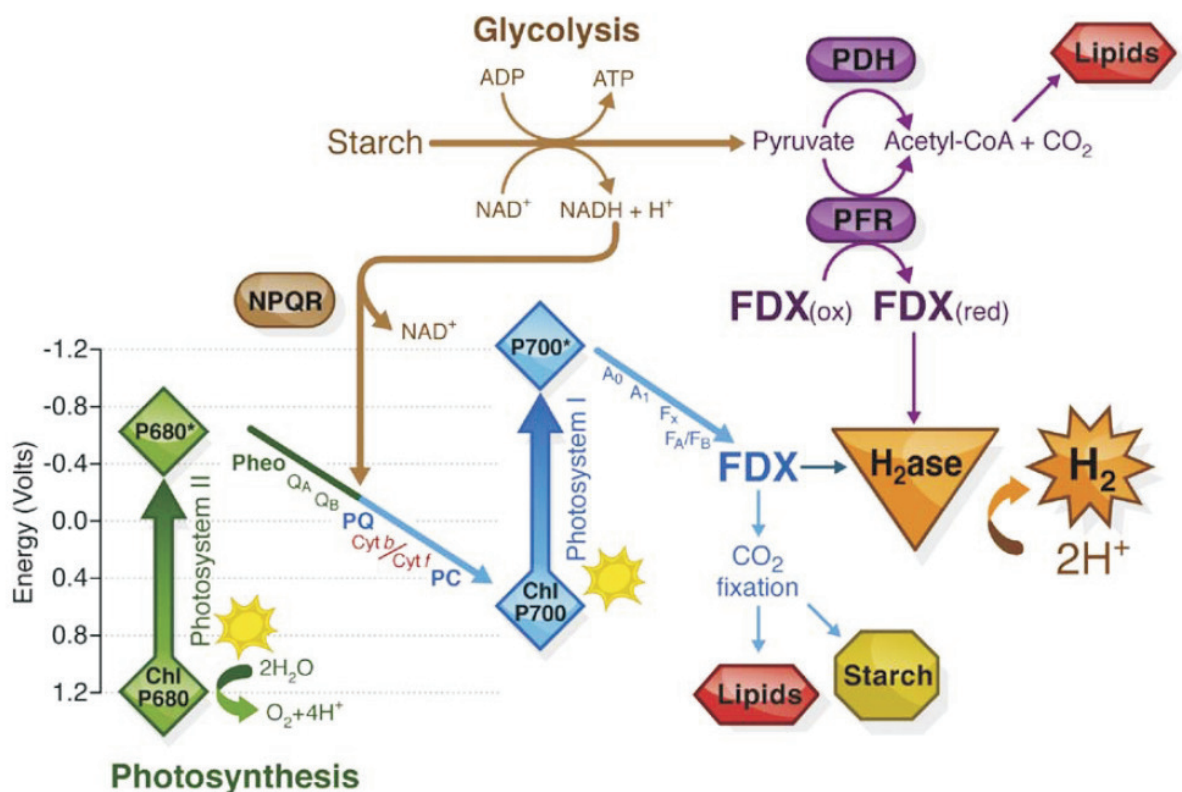


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung von photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Reaktionswegen in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* zur Bildung von Wasserstoff^[18].

Die Verwendung von Algen als nachwachsender Rohstoff scheint unbegrenzt zu sein. Sei es zur Ergänzung von essentiellen Mineralien in unserer Nahrung, zur Herstellung von Treibstoffen in Form von Biodiesel, Bioethanol und Biowasserstoff, oder zur Stromherstellung. Durch die Verwendung der in der Natur am häufigsten vorkommenden Rohstoffe, Sonnenlicht und Wasser, können wir in Zukunft mit Hilfe von Algen einen sehr großen und nachhaltigen Beitrag zur Reduzierung klimaschädlicher Emissionen leisten. Aus diesem Grund ist es heute wichtiger denn je die Grundlagenforschung an Algen weiter zu entwickeln und zu vertiefen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit biochemischen Charakterisierungen und strukturellen Untersuchungen von Protein(super)komplexen aus Algen und einem Cyanobakterium. In den Abschnitten 2.3 und 2.4 werden zwei der verwendeten Organismen näher beschrieben. Ausführliche Beschreibungen der ebenfalls eingesetzten Organismen *Chlamydomonas reinhardtii*

tii, *Nostoc muscorum* und *Cyanophora paradoxa* können in einer anderen Arbeit nachgelesen werden^[19].

2.3 *Euglena gracilis*

Euglena gracilis gehört zur Gattung der Augentierchen und stellt eine einzellige, eukaryontische Lebensform dar, die sowohl pflanzliche als auch tierische Eigenschaften aufweist. Das Vorhandensein eines Augenflecks befähigt *E. gracilis* zur Phototaxis. Je nachdem wie die Zelle orientiert ist, belichtet oder beschattet der mit Pigmenten gefüllte Augenfleck einen Photorezeptor, wodurch *E. gracilis* immer in Richtung des Lichts schwimmt. Hierbei nutzt der Organismus zwei Geißeln zur Fortbewegung. *E. gracilis* besitzt ein als Retikulum die Zelle durchspannendes, einzelnes Mitochondrium sowie Chloroplasten in denen im Unterschied zu höheren Pflanzen keine Stärke gespeichert wird, sondern das β -D-(1 \rightarrow 3)-Glucan Paramylon. Interessanterweise werden die Chloroplasten aus *E. gracilis* von einer dritten Membran umschlossen, was auf eine stattgefundene Endosymbiose mit einer eukaryontischen Alge zurückzuführen sein könnte^[20]. Die Zellen besitzen durchschnittlich eine Länge von etwa 50 μ m und eine Breite von ca. 10 μ m. Ebenfalls ungewöhnlich für Algen oder höhere Pflanzen ist die äußere Hülle von *E. gracilis*, die aus einer proteinreichen Pellikula besteht. Diese relativ flexible Hülle ermöglicht es der Zelle, zwischen einer zylindrischen und eher sphärischen Gestalt zu variieren. Abbildung 2.4 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme von *E. gracilis*-Zellen, Abbildung 2.5 eine Aufnahme der Zellen nach Fluoreszenzanregung.

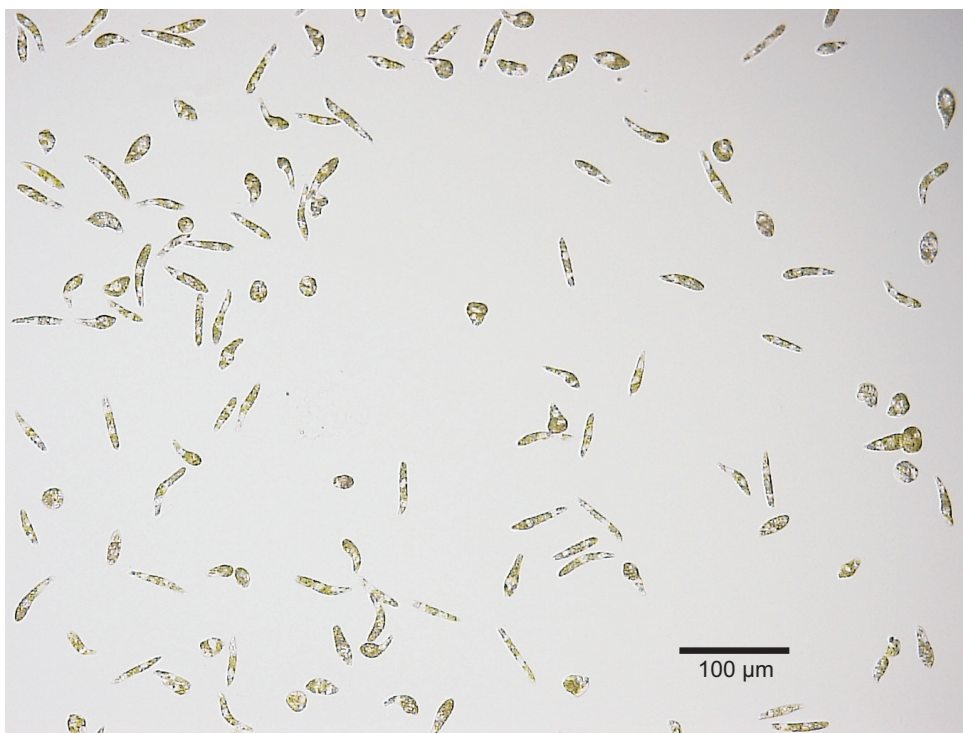


Abbildung 2.4: Lichtmikroskopische Aufnahme von *E. gracilis*-Zellen. Die Zellen weisen eine durchschnittliche Länge von etwa 50 μ m und eine Breite von ca. 10 μ m auf. Auf Grund der relativ flexiblen Pellikula kann die Zelle eine zylindrische bis eher sphärische Morphologie annehmen.

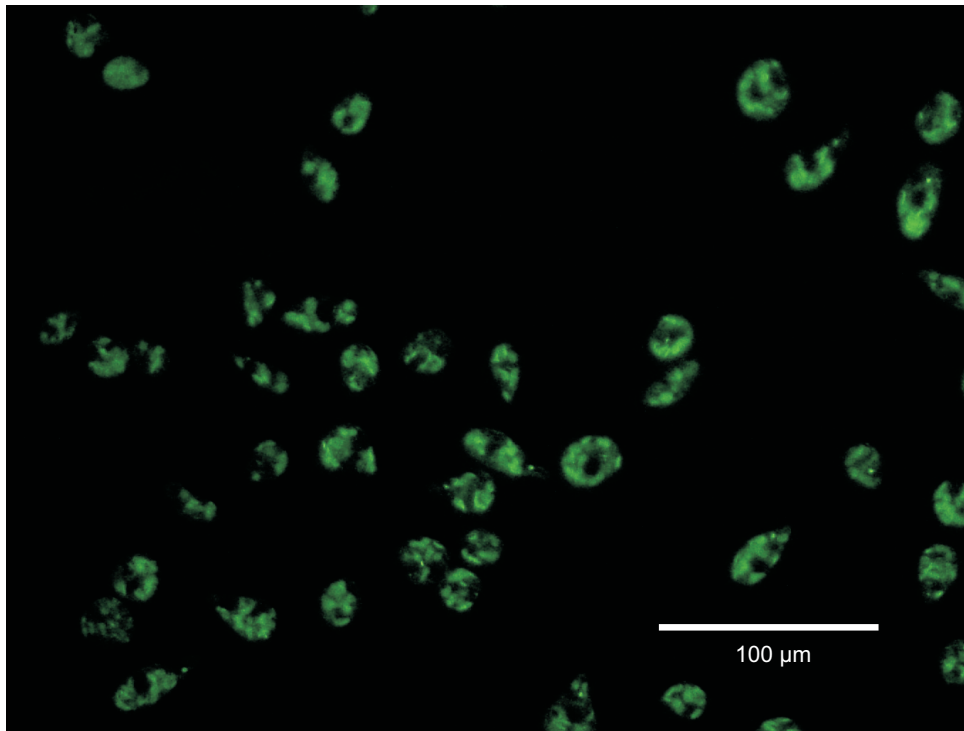


Abbildung 2.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *E. gracilis*-Zellen. Deutlich sind die Chloroplasten der Zellen zu erkennen, deren Chlorophylle nach Fluoreszenzanregung Licht emittieren.

In der Regel wächst *E. gracilis* unter photoautotrophen Bedingungen, betreibt also Photosynthese. Unter Zugabe von beispielsweise Acetat zum Anzuchtmedium als Kohlenstoffquelle ist eine heterotrophe Kultivierung im Dunkeln ebenfalls möglich. Während des Zellwachstums im Dunkeln verändern sich die Chloroplasten zu farblosen Proplastiden, bilden sich allerdings nach Lichtanregung wieder vollständig zu Chloroplasten zurück, sodass die Zelle erneut Photosynthese betreiben kann. Im Allgemeinen stellt *E. gracilis* eine sehr widerstandsfähige Lebensform dar. So bilden die Zellen eine gewisse Resistenz gegen Schwermetall-Ionen wie beispielsweise Cd^{2+} und Hg^{2+} [21] aus. Ebenfalls bemerkenswert ist die Fähigkeit von *E. gracilis* in einem Temperaturbereich von 1 – 38 °C sowie einem pH-Bereich von 2,3 bis 11 zu überleben [22]. Im Zusammenhang mit Forschungsarbeiten bezüglich der Mechanismen zur Stress-Resistenz in *E. gracilis* konnte viel über die Atmungskette in diesem Organismus gelernt werden [23]. Wie in vielen anderen Pflanzen besitzt auch *E. gracilis* neben den klassischen Komponenten der Atmungskette eine alternative Oxidase (AOX). Diese scheint eine besondere Rolle in Mitochondrien einzunehmen, wenn die Zelle erhöhtem Stress ausgesetzt ist [24]. Ähnlich wie Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette katalysiert die AOX die Reduktion von Sauerstoff zu Wasser, ohne jedoch dabei Protonen in den Intermembranraum des Mitochondriums zu pumpen. Bisher gibt es noch keine Kristallstruktur einer AOX, aber man geht davon aus, dass das Enzym als Homodimer (apparente Molekularmasse des Monomers etwa 33 kDa) über zwei hydrophobe α -Helices matrixseitig mit der inneren Mitochondrienmembran verankert ist, diese also nicht durchspannt. Auch der Mechanismus der katalytischen Bildung von Wasser ist noch nicht aufgeklärt, aber es steht fest, dass die Reaktion an zwei Nicht-Häm-Eisenzentren abläuft. Zusätzlich

zum katalytischen Zentrum muss die AOX auch eine Bindestelle für das reduzierende Substrat Ubichinon enthalten. Es ist allerdings ebenfalls noch nicht bekannt, wie diese aussieht^[25–27].

2.4 *Astasia longa*

Astasia longa gehört wie *E. gracilis* zur Klasse der Euglenoida, es besteht also eine sehr nahe Verwandtschaft zwischen diesen beiden Organismen. Sowohl die Gestalt, ebenfalls spindelförmig, als auch die Maße von *A. longa*, etwa 40 – 70 µm lang und ca. 10 µm breit, ähneln denen von *E. gracilis*. *A. longa* speichert Energie in Form des Polysaccharids Paramylon, genauso wie ihr photoautotropher Verwandter *E. gracilis*. Allerdings kann *A. longa* nur heterotroph wachsen, ist also nicht zur Photosynthese befähigt. Dementsprechend besitzt dieser Organismus auch keine Chloroplasten und ist somit farblos. Abbildung 2.6 zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme einer *A. longa*-Zelle.

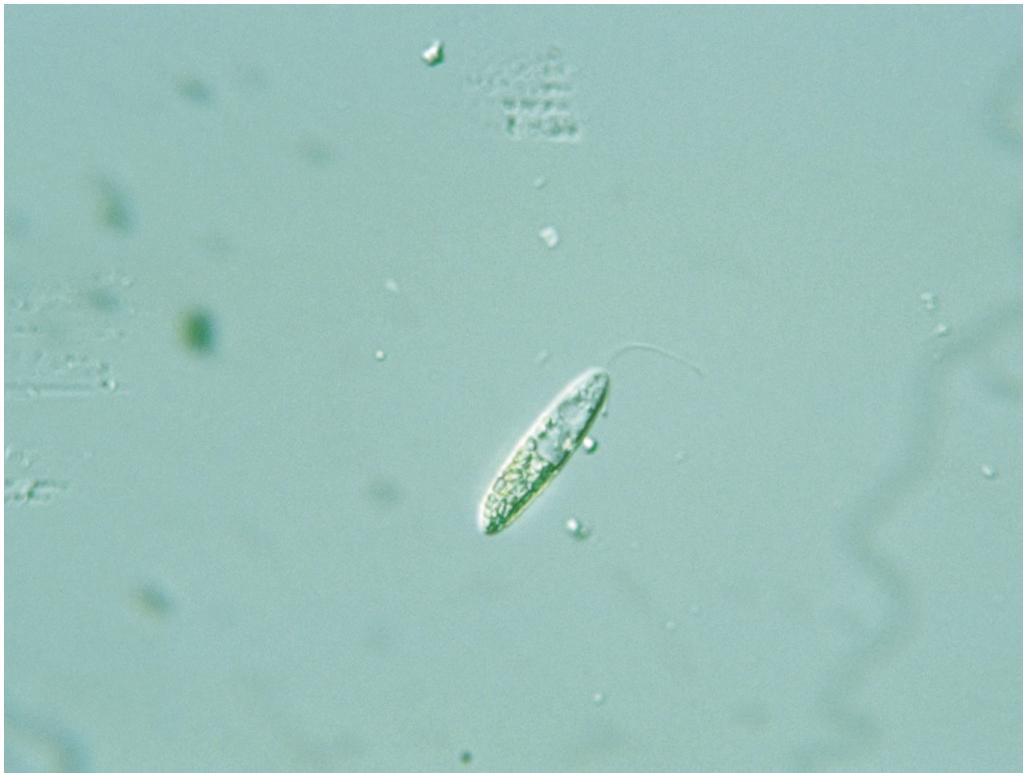


Abbildung 2.6: Lichtmikroskopische Aufnahme einer *A. longa*-Zelle. Dieser Einzeller ähnelt in Gestalt und Maßen *E. gracilis*. Das Fehlen von Chloroplasten und der damit einhergehenden Unfähigkeit zum Betreiben von Photosynthese unterscheidet beide Organismen voneinander (Abbildung von <http://protist.i.hosei.ac.jp/PDB5/PCD0021/D/86.jpg>).

Beim Vergleich des Plastidengenoms von *A. longa* mit dem Chloroplastengenom von *E. gracilis* fallen neben großen Unterschieden auch einige Gemeinsamkeiten auf. Mit ca. 73000 Nukleotidpaaren ist das Plastidengenom von *A. longa* nur etwa halb so groß wie die Chloroplasten-DNA (cpDNA) von *E. gracilis* (145000 Basenpaare). Beide Organismen beinhalten Gene für die RNA-Polymerase, ribosomale Proteine, ribosomale RNA- und Transfer-RNA-Moleküle in ähnlicher Anzahl. In der Plastiden-DNA (ptDNA) von *A. longa* findet man, mit einer Ausnahme, keine

Gene, die für photosynthesebezogene Proteine kodieren. Lediglich das Gen *rbcL* für die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase (RuBisCO), das Enzym, das die CO₂-Fixierung katalysiert, ist im Plastidengenom von *A. longa* zu finden. In Tabelle 2.1 ist eine Gegenüberstellung der Anzahl an Genen der ptDNA aus *A. longa* und *E. gracilis* gezeigt. Bezüglich der Anordnung und Gruppierung bestimmter Gene auf dem Genom sowie der Feinstruktur und Sequenz einzelner Gene sind für *A. longa* viele Gemeinsamkeiten zum Chloroplastengenom von *E. gracilis* zu erkennen. Diese Gemeinsamkeiten bilden die Basis für die Vermutung, dass *A. longa* von einem photosynthetisch aktiven Flagellaten abstammt, der wiederum Ähnlichkeiten zu rezenten Vertretern der Gattung *Euglena* aufweist. Anders als bei anderen *Euglena*-Arten fand bei *A. longa* allerdings ein Wechsel der photoautotrophen Ernährungsweise hin zur Heterotrophie statt^[28,29].

Tabelle 2.1: Vergleich der Anzahl an Genen der Plastiden-DNA aus *E. gracilis* und *A. longa*^[29].

Kodierende Gene für	Genanzahl in	
	<i>Euglena gracilis</i>	<i>Astasia longa</i>
RNA-Polymerase, drei Untereinheiten (C, C1, C2)	3	3
Ribosomale RNA (23S, 5S und 16S rRNA)	3, 3, 4	3, 3, 4
große Ribosomen-Untereinheit	10	10
kleine Ribosomen-Untereinheit	11	10
Transfer RNA	27	27
Translationsfaktor Tu	1	1
RuBisCO (große Untereinheit)	1	1
Photosystem I	5	0
Photosystem II	11	0
Cytochrom <i>b₆f</i>	2	0
ATP-Synthase	6	0
nicht identifizierte Leserahmen für Proteine mit mehr als 50 Aminosäuren	15	21

2.5 Ziele der Arbeit

Seit mehr als 10 Jahren ist bekannt, dass in Mitochondrien z. B. aus Säugern^[30–32] und höheren Pflanzen^[33] die Atmungskettenkomplexe I, III und IV in Form von Superkomplexen zusammengelagert sind. Trotz elektronenmikroskopischer Beweise^[34] und der Annahme der effizienteren Elektronenübertragung innerhalb der Atmungskette wird bis heute in der Literatur sehr kontrovers über die Existenz von mitochondrialen Superkomplexen diskutiert. Ebenso bietet die Dimerisierung von ATP-Synthasen aus Mitochondrien^[35] und Chloroplasten^[36] lange nach deren Entdeckungen weiterhin Anlass zur Diskussion. Es ist zwar denkbar, dass diese Dimere strukturgebend für Krümmungen von inneren Membranen in Mitochondrien^[37] und Chloroplasten sind, aber man kennt deren Funktionsweisen noch nicht.

Ziel dieser Arbeit ist, es neue Einblicke in die Struktur und Funktionsweise von pflanzlichen Proteinsuperkomplexen sowie ATP-Synthase-Dimeren aus Chloroplasten zu erhalten. Hierzu erfolgen Untersuchungen an Proteinen und Organellen aus verschiedenen Organismen (*C. rein-*

hardtii, *E. gracilis*, *A. longa*, *N. muscorum* und *C. paradoxa*). Für strukturelle Analysen soll die Transmissions-Elektronenmikroskopie (Max-Planck-Institut in Frankfurt am Main) zum Einsatz kommen. Mit Hilfe der Einzelpartikelanalyse ist es möglich, hochreine, isolierte Protein(super)-komplexe elektronenmikroskopisch abzubilden und einen Eindruck von deren Struktur zu erhalten. Für Struktur-Untersuchungen von ATP-Synthase-Dimeren direkt in Chloroplasten eignet sich die Cryo-Elektronen-Tomographie. Mittels dieser Methode werden verschiedene Ebenen innerhalb von Thylakoidmembranen inklusive der darin enthaltenen Proteinkomplexe abgebildet. Beide Methoden stellen relativ hohe Anforderungen an die Probenreinheit, sodass ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin besteht, sowohl reine Proteinsuperkomplexe in ausreichend hoher Konzentration zu isolieren als auch wenig verunreinigte Chloroplasten aus Organellengemischen zu erhalten.

Durch milde Solubilisierungen von Mitochondrien werden hydrophobe Membranproteine in Lösung gebracht. Zur Aufreinigung dieser Proteinmischungen sollen Methoden der Dichtegradientenzentrifugation bzw. der nativen Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) eingesetzt werden. Im Anschluss an die native PAGE (blau-nativ (BN) mit Coomassie G-250 oder farblos-nativ (CN)) müssen die interessierenden Protein(super)komplexe aus der Gelmatrix eluiert (Diffusions- oder Elektroelution) und mittels Ultrafiltration konzentriert werden.

Zur Isolierung von Chloroplasten aus Organellenmischungen eignen sich ebenfalls Dichtegradientenzentrifugationen. Hier ist allerdings darauf zu achten, Gradientenmedien mit niedrigen Osmolaritäten zu verwenden (Percoll[®] oder Optiprep[™]). Zur elektronenmikroskopischen Abbildung von ATP-Synthase-Dimeren aus Chloroplasten müssen Thylakoidmembranen abgetrennt und gestapelte Regionen (Grana) entstapelt werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist die biochemische Charakterisierung von mitochondrialen Proteinkomplexen wie Atmungskettenkomplexe, ATP-Synthasen, Hitzeschock-Proteine und Prohibitin mit Hilfe von *In-Gel*-Aktivitätstests und immunologischen Analysenmethoden.

3 Material

3.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
Aceton, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Acrylamid, Rotiphorese [®] A	Carl Roth GmbH & Co. KG	3037.1
Acrylamid/Bisacrylamid 29:1	Carl Roth GmbH & Co. KG	A515.1
Adenosin-5'-triphosphat, Natriumsalz	Sigma Chemical CO.	A3377
6-Aminocapronsäure, ≥ 98,5 %	Fluka Chemie GmbH	07260
Ammoniumchlorid, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	K298.1
Ammoniumheptamolybdat Tetrahydrat	Fluka Chemie GmbH	09878
Ammoniumperoxodisulfat, p. A.	Fluka Chemie GmbH	09915
Ammoniumsulfat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	3746.1
Ammoniumsulfid, 20 %ig in Wasser	Sigma Chemical CO.	A1952
Antimycin A	Sigma Chemical CO.	A8674
ASB-C8 ϕ	Calbiochem	182730
L-Asparagin	Fluka Chemie GmbH	11150
Bicin, ≥ 99,5 %	Fluka Chemie GmbH	14871
D-(+)-Biotin ≥ 98,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	3822.1
Bisacrylamid Rotiphorese [®] B	Carl Roth GmbH & Co. KG	3039.1
Bis-Tris, ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH	14880
Blei(II)nitrat, p. A.	Fluka Chemie GmbH	15344
Borsäure, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	6943
Bovine Serum Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH & Co. KG	8076.2
5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat, Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG	A155.2
Bromphenolblau	Fluka Chemie GmbH	18030
Calciumchlorid Dihydrat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	5239
Cardiolipin aus Rinderherz, ≥ 98 %	Sigma Chemical CO.	1649
Chemilumineszenz Substrat SuperSignal [®] West Dura	Pierce	34.076
Cobaltchlorid Hexahydrat	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Cobaltsulfat Heptahydrat	Acros	2131
Coomassie [®] Brilliant Blue G-250	Serva	17524.01
Coomassie [®] Brilliant Blue R-250	Fluka Chemie GmbH	27816
Cymal 5 Anagrade [®]	Anatrace	C325
Cymal 6	Fluka Chemie GmbH	29396

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
L-Cystein, $\geq 99,5\%$	Fluka Chemie GmbH	30089
Cytochrom c aus Rinderherz	Fluka Chemie GmbH	30398
Decanoyl-D-Saccharose	Calbiochem	252721
<i>n</i> -Decyl- β -D-maltopyranosid	Calbiochem	252718
Decylubichinon	Sigma Chemical CO.	D7911
<i>N,N'</i> -(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid, 97 %	Aldrich	294381
Digitonin ^a	Calbiochem	300410
Dikaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie GmbH	60353
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Merck KGaA	2937
Dimethylsulfoxid, $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	A994.2
Dinatriumhydrogenphosphat, p. A.	Fluka Chemie GmbH	71642
Dinatriumoxalat, p. A.	Merck KGaA	1.06557
Dinatriumsuccinat Hexahydrat	Sigma Chemical CO.	S2378
1,4-Dithiothreitol, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	6908.2
DNase I aus Rinder-Pankreas	Sigma Chemical CO.	D4527
Dodecanoyl-D-saccharose	Calbiochem	324374
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid	Calbiochem	324355
Eisen(III)chlorid Hexahydrat, p. A.	Merck KGaA	1.03861
Eisen(II)sulfat Heptahydrat	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Essigsäure, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	3738.5
Ethanol, $\geq 99,8\%$ (vergiftet)	Carl Roth GmbH & Co. KG	K928.3
Ethanol, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Ethylendiamintetraacetat, Dinatrium-Salz, Dihydrat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	8043.3
Ethylenglykol-bis(β -aminoethylether)-tetraacetat, Tetranatriumsalz $\geq 97\%$	Sigma Chemical CO.	E8145
Ethylviolett	Fluka Chemie GmbH	05025
Fluoreszenzfarbstoff DY-505 X5 NHS	Dyomics GmbH	
Formaldehyd, 37 %ig, p. A.	Sigma Chemical CO.	25,254-9
D-(+)-Glucose	Merck KGaA	108342
L-Glutaminsäure, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	3774.1
Glycerin, $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	7530
β -Glycerophosphat Pentahydrat	Calbiochem	35675
Glycin, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	3908.2
HEPES	Carl Roth GmbH & Co. KG	9105.4
Imidazol	Fluka Chemie GmbH	56750
4-Iodphenylborsäure	Aldrich	471933

^a bis 01.10.2008 von AppliChem (Chargen-Nr.: 5H007912), seit 01.10.2008 von Calbiochem (Chargen-Nr.: D00033214)

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
Isopropanol, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Kaliumacetat, p. A.	Fluka Chemie GmbH	60034
Kaliumchlorid, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	6781.1
Kaliumcyanid, $\geq 98\%$	Fluka Chemie GmbH	60178
Kaliumdihydrogenphosphat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	3904.1
Kaliumhydroxid, p. A.	Fluka Chemie GmbH	60370
Kupfer(II)sulfat Pentahydrat, p. A.	Merck KGaA	102790
Luminol	Fluka Chemie GmbH	09253
L-Lysin, $\geq 98\%$	Sigma Chemical CO.	62840
Magnesiumchlorid Hexahydrat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	A537.1
Magnesiumsulfat Heptahydrat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	P027.2
Mangan(II)chlorid Tetrahydrat, p. A.	Fluka Chemie GmbH	63543
D-(–)-Mannit	Carl Roth GmbH & Co. KG	4175
MES $\geq 99,5\%$	AppliChem GmbH	A0689
Methanol, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	4627.6
Methanol, technisch	Chemikalienausgabe FB Chemie	
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG	T145.3
Molekularmassenstandard HMW	Amersham	17-0445-01
Molekularmassenstandard LMW	Amersham	17-0446-01
Molekularmassenstandard MagicMark™	Invitrogen	LC5602
MOPS	Carl Roth GmbH & Co. KG	6979.4
β -NADH	Sigma Chemical CO.	N6005
Natriumacetat Trihydrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	6779
Natriumazid, $\geq 99\%$	Sigma Chemical CO.	S2002
Natriumbenzoat, $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	8548.1
Natriumcarbonat, $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	A135.2
Natriumchlorid, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	3957.1
Natrium-Desoxycholat, $\geq 99\%$ (TLC)	Calbiochem	264103
Natriumdodecylsulfat, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	2326.1
Natriumfluorid, $\geq 99\%$	Sigma Chemical CO.	S-1504
Natriumhydroxid, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	6771.1
Natriummolybdat Dihydrat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	0274.1
Natriumnitrat, p. A.	Merck KGaA	106537
Natriumorthovanadat	Aldrich	22,059-0
Natriumphosphat Dodecahydrat	Fluka Chemie GmbH	71642
Natrium-Taurodesoxycholat	Calbiochem	580221
Natriumthiosulfat Pentahydrat, p. A.	Merck KGaA	106516
NBT, $\geq 98\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG	4421.4

Chemikalie	Hersteller	Artikel-Nr.
Optiprep™ (Iodixanol)	Axis-Shield	1114542
Percoll®	Sigma Chemical CO.	1644
Phenylmethylsulfonylfluorid, ≥ 99 %	Fluka Chemie GmbH	78830
L-α-Phosphatidylcholin aus Eigelb	Sigma Chemical CO.	P2772
Polyvinylpyrrolidon (PVP-40)	Carl Roth GmbH & Co. KG	4607.1
Ponceau S	Sigma Chemical CO.	P3504
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma Chemical CO.	P9599
Pyrogallolrot, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	0287.1
Rotenon 95–98 %	Sigma Chemical CO.	R8876
Roti®-Block, 10x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	A151.2
Roti®-Blot A, 10x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	P037.1
Roti®-Blot K, 10x Konzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG	P038.1
Roti®-Free	Carl Roth GmbH & Co. KG	0083.1
D-(+)-Saccharose, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	4621.2
Salzsäure rauchend 37 %, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	4625.1
Schwefelsäure ≥ 95 %, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	4623.1
Selenige Säure, ≥ 97 %	Fluka Chemie GmbH	84920
L-Serin, ≥ 98,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	4682.1
Silbernitrat, p. A.	Carl Roth GmbH & Co. KG	7908.1
D-Sorbit, ≥ 98 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	6213.1
TEMED, ca. 99 %	Sigma Chemical CO.	T9281
Tricin, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	6977.3
Tris, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	4855.2
Triton X-100	Calbiochem	648465
Trypsin Inhibitor Type II-O aus Hühnereiweiß	Sigma Chemical CO.	T9253
Trypsin TypII-S aus Schweine-Pankreas	Sigma Chemical CO.	T7409
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG	9127.1
Vitamin B ₁ , ≥ 98,5 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	T911.1
Vitamin B ₁₂ , ≥ 96 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	T915.1
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA	107209
Zincon Natriumsalz	Fluka Chemie GmbH	96440
Zinksulfat Heptahydrat, ≥ 99 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	T884.2

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät	Hersteller
Algenaufzuchtbecken	
Autoklav Varioklav	H+P Labortechnik
Centriprep® YM-50 Konzentratoren	Amicon-Millipore

Gerät	Hersteller
Digitalkamera EOS 300D Digital	Canon
Einamliküvetten PMMA, Schichtdicke 1 cm	Brand
Elektroelutoren und Elektroelutionskammern	Werkstatt FB Chemie
Elektrophoresis Power Supply EPS 301, 601	Amersham Pharmacia Biotech
Faltenfilter 595 1/2, Ø 240 mm	Schleicher & Schuell
Folienschweißgerät	Severin
Gelelektrophorese-Apparatur SE 250, Mighty Small II	Pharmacia
Gelelektrophorese-Apparatur SE 260, Mighty Small II	Pharmacia
Gelelektrophorese-Apparatur SE 400	Hoefer
Gelelektrophorese-Apparatur SE 600X	Pharmacia
Gel- und Western-Blot-Färbeschalen MINI und MIDI, PP	Carl Roth GmbH & Co. KG CP57.1
Gelgießapparatur SE 245	Pharmacia
Gelgießapparatur SE 275 (4er-Apparatur)	Pharmacia
Glaskugeln Ø 425 – 600 µm	Sigma Chemical CO.
Gradientenmischer 2x18 mL	Werkstatt FB Chemie
Gradientenmischer 2x50 mL	Sigma Chemical CO. G7022
Gradientenmischer 2x120 mL	neoLab 7-0123
Greiner-Röhrchen 12 mL	Greiner
Greiner-Röhrchen 50 mL	Greiner
GS-800 Calibrated Densitometer	BioRad
GS-3-Zentrifugenbecher	Nalge Company
Klebefolie für 96-Lochplatte	Greiner
Kühlgerät DLK 1002	Fryka Kältetechnik GmbH
Kühlgerät Julabo F30	Julabo
Leuchttisch	Desa Sarstedt Grupper
96-Loch Platte, PS	Greiner
Luminescent Image Analyzer LAS-3000	Fujifilm
Magnetrührer AGE	VELP® Scientifica
Magnetrührer MR 3001	Heidolph
Magnetrührer Multipoint HP6	Variomag®
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik
Membranfilter RC 55, Ø 47 mm, 0,45 µm	Schleicher und Schuell
Membranfilter RC 58, Ø 50 mm, 0,2 µm	Schleicher & Schuell
Multipette plus	Eppendorf
Pasteur-Pipette, graduert	Carl Roth GmbH & Co. KG
Pasteur-Pipette, lange Spitze	Carl Roth GmbH & Co. KG
pH-Elektrode BlueLine 14 pH	Schott
pH-Meter CG 842	Schott

Gerät	Hersteller
Pipetten 10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL, 5000 µL	Abimed-Gilson
Plattenlesegerät POLARstar Galaxy	BMG
Quarzglasküvetten, Schichtdicke 1 cm	Hellma
Reaktionsgefäße 0,2 mL	Axygen
Reaktionsgefäße 1,5 mL	Gesellschaft für Laborbedarf
Reaktionsgefäße 2 mL	Eppendorf
Rotationsverdampfer Rotavapor R	Büchi
Rotilabo®-Blottingpapiere, 1,5 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG CL75.1
Rotiprotect®-Latexhandschuhe puderfrei Typ 2	Carl Roth GmbH & Co. KG L951.1
Roti-Spin® MINI-100	Carl Roth GmbH & Co. KG
Roti-Spin® MINI-30	Carl Roth GmbH & Co. KG
Rundfilter 595, Ø 90 mm	Schleicher & Schuell
Schlauch Ø 1,85 mm	VWR International GmbH 224-2733
Schlauch Ø 2,79 mm	VWR International GmbH 224-2737
Schlauchpumpe Minipuls 3	Gilson
Schüttelgrät 3016	GFL
Sequi-Blot™ PVDF Membran	BioRad
Spektralphotometer UV-2102 PC	Shimadzu
Spektralphotometer UV-2401 PC	Shimadzu
SS-34-Zentrifugenröhrchen	Nalge Company
SW-28-Zentrifugenröhrchen	Beckman
SW-41-Zentrifugenröhrchen	Beckman
Thermometer	Carl Roth GmbH & Co. KG
THOMAPOR®-Dialyseschlauch	Reichelt Chemietechnik GmbH & Co.
Ti-70 Zentrifugenröhrchen	Beckmann
Tischzentrifuge MicroV	Fisher Scientific
Trans-Blot®SD Electrophoretic Transfer Cell	BioRad 170-3940
Transilluminator blue light (470 nm) BST-20-G-8R	BioView
Ultraschallbad Sonorex TK 52 H	Bandelin
Ultrazentrifuge Optima™ LE 80K	Beckmann
Vakuumflasche mit Membraneinsatz, XX 15 04705	Millipore
Vakuumkonzentrator Univapo 150H	Uni Equip
Vakuumpumpe MZ 2C/2,4	Vacubrand
Vakuumpumpe Unijet II	Uni Equip
Vortexer VF2	IKA Labortechnik
Waage R 200 D	Sartorius
Waage U 4100 S	Sartorius
Wasseraufbereitungssystem Simplicity	Millipore

Gerät	Hersteller
Wasserbad	GFL
Wasserstrahlpumpe	Brand
Zentrifuge 5804R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge primo R	Heraeus
Zentrifuge RC-5B	Sorvall
Zentrifugenrotor # 7588	Heraeus
Zentrifugenrotor # 7593	Heraeus
Zentrifugenrotor A-4-44	Eppendorf
Zentrifugenrotor F45-30-11	Eppendorf
Zentrifugenrotor GS-3	Sorvall
Zentrifugenrotor HB-4	Sorvall
Zentrifugenrotor SS-34	Sorvall
Zentrifugenrotor SW-28	Beckman
Zentrifugenrotor SW-41	Beckman
Zentrifugenrotor Ti-70	Beckman

3.3 Software

Programm	Hersteller
Chem Draw Ultra	Cambridge Soft. Com
Corel Graphics Suite 11	Corel Systems
FLUOstar Galaxy V4.21-0 / Stacker Control V1.01-0	BMG Labtechnologies
Image Reader LAS-3000 für Windows, Version 2.1	Fujifilm
MS Excel 2007	Microsoft
Origin 6.1	Microcal
Textsatzprogramm	L ^A T _E X



4 Methoden

4.1 Kulturmedien und Anzucht der Organismen

4.1.1 *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*)

Die Grünalge *C. reinhardtii* (SAG 83.81, cw-15-Mutante) kann in einem Anzuchtmedium mit hohen Konzentrationen verschiedener Mineralsalze (Sueoka High-Salt Medium) photoautotroph wachsen. Hierbei nutzt die Alge Licht und Kohlenstoffdioxid aus der Luft zur Kohlenstofffixierung als Energiequelle. *C. reinhardtii* ist jedoch auch in der Lage zusätzlich zum Kohlenstoffdioxid aus der Luft Kohlenstoff aus Acetat zu assimilieren^[38]. Die Mischung aus photoautotrophem und photoheterotrophem Wachstum nennt man photomixotroph. In den folgenden Tabellen 4.1, 4.2 und 4.3 sind die jeweiligen Bestandteile und Konzentrationen der Medien aufgeführt. Die Anzucht von *C. reinhardtii* erfolgt in 5 L des jeweiligen Kulturmediums (photoauto- oder photomixotroph), welches zuvor über Nacht zur Sterilisierung mindestens 30 min bei 121 °C autoklaviert wird. Das Medium wird mit 25 mL einer *C. reinhardtii* Vorkultur unter sterilen Bedingungen angeimpft und bei ca. 22 °C Wasserbadtemperatur kultiviert. Über Belüftungsrohre, die an der Flaschenöffnung angebracht sind, begast man die Grünalgen mit 90 L h⁻¹ Luft per Kompressor und belichtet die Kultur mittels seitlich angebrachter Leuchtstoffröhren (Osram L18 W/25, Universal weiß, 250 μmol Photonen m⁻² s⁻¹). Nach vier Tagen der Kultivierung in einem 12-stündigen Tag/Nacht-Rhythmus erfolgt die Ernte der Alge zu Beginn der Tagphase^[39].

Tabelle 4.1: Mediumzusammensetzung für photoautotrophe Anzucht.

Sueoka High-Salt Medium (HS)		Beijerinck's Lösung	
5 mL L ⁻¹	Beijerinck's Lösung	18,7 · 10 ⁻¹ mol L ⁻¹	NH ₄ Cl
5 mL L ⁻¹	Phosphatlösung	1,60 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
1 mL L ⁻¹	Hutner-Spurenelemente	1,40 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	CaCl ₂ · 2 H ₂ O

Tabelle 4.2: Mediumzusammensetzung für photomixotrophe Anzucht.

TAP-Medium		TAP-Salze	
2,42 g L ⁻¹	Tris	2,8 · 10 ⁻¹ mol L ⁻¹	NH ₄ Cl
1 g L ⁻¹	Natriumacetat	1,6 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
25 mL L ⁻¹	TAP-Salze	1,4 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
375 μL L ⁻¹	Phosphatlösung		
pH 7,0	mit Essigsäure einstellen		
1 mL L ⁻¹	Hutner-Spurenelemente		

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der Hutner-Spurenelemente und der Phosphatlösung.

Hutner-Spurenelemente		Phosphatlösung	
50 g L ⁻¹	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	1,263 mol L ⁻¹	K ₂ HPO ₄
22 g L ⁻¹	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	1,058 mol L ⁻¹	KH ₂ PO ₄
11,4 g L ⁻¹	H ₃ BO ₃		
5,06 g L ⁻¹	MnCl ₂ · 4 H ₂ O		
1,61 g L ⁻¹	CoCl ₂ · 6 H ₂ O		
1,57 g L ⁻¹	CuSO ₄ · 5 H ₂ O		
1,1 g L ⁻¹	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O		
4,99 g L ⁻¹	FeSO ₄ · 7 H ₂ O		

4.1.2 *Euglena gracilis* (*E. gracilis*)

Die Kultivierung von *E. gracilis* (SAG 1224-5/25) erfolgt photomixotroph in einem Medium nach Pringsheim und Wiessner^[40] und in analoger Weise zur beschriebenen Anzucht der Grünalge *C. reinhardtii*. Die Ernte der Zellen wird nach einer Woche durchgeführt.

Tabelle 4.4: Zusammensetzung des Kulturmediums für *E. gracilis* nach Pringsheim und Wiessner^[40].

Pringsheim und Wiessner-Medium		Eisen-EDTA-Lösung	
1,62 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	MgSO ₄ · 7H ₂ O	2,50 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	FeSO ₄ · 7 H ₂ O
2,30 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	KH ₂ PO ₄	2,50 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O
2,31 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Spurenelemente	
7,57 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄	9,8 g L ⁻¹	ZnSO ₄ · 7 H ₂ O
1 mL L ⁻¹	Eisen-EDTA-Lösung	1,73 g L ⁻¹	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
1 mL L ⁻¹	Spurenelemente	12,4 g L ⁻¹	H ₃ BO ₃
1,19 · 10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	Vitamin B ₁	0,56 g L ⁻¹	CoSO ₄
1,48 · 10 ⁻⁹ mol L ⁻¹	Vitamin B ₁₂	1,25 mg L ⁻¹	CuSO ₄ · 5 H ₂ O
5,05 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Glucose	0,74 g L ⁻¹	NaNO ₃
1,36 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	L-Glutaminsäure	1,2 g L ⁻¹	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O

4.1.3 *Astasia longa* (*A. longa*)

Bei *A. longa* (SAG 1204-17a) handelt es sich um eine farblose Verwandte von *E. gracilis*, die keine Chloroplasten enthält und somit nicht zur Photosynthese befähigt ist^[41,42]. Das Kulturmedium für *A. longa* ist identisch mit dem von *E. gracilis* (siehe Tabelle 4.4), da das Wachstum allerdings ausschließlich heterotroph stattfindet, werden die Zellen durch Abdecken der Vor- kulturflaschen mit Aluminiumfolie vor Tageslicht geschützt. Die Ernte von *A. longa* findet nach einer Woche Wachstum statt.

4.1.4 *Nostoc muscorum* (*N. muscorum*)

Das Cyanobakterium *N. muscorum* (SAG 25.82) wird in DY-V Medium nach Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP, leicht modifiziert nach <https://ccmp.bigelow.org/index.php?q=node/73>) kultiviert, dessen Zusammensetzung in Tabelle 4.5 aufgelistet ist. 5 L des autoklavierten Mediums werden mit etwa 20 mL der *N. muscorum* Vorkultur angeimpft und in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus mit $250 \mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$ belichtet und mit 90 L h^{-1} Luftsauerstoff unter leichtem Rühren bei 22°C begast. Da das Wachstum des Cyanobakteriums im Vergleich zu den oben erwähnten Grünalgen langsamer von statten geht, erfolgt die Ernte der Kultur etwa nach zwei bis drei Wochen.

Tabelle 4.5: Zusammensetzung des DY-V Mediums, modifiziert nach Provasoli-Guillard National Center for Culture of Marine Phytoplankton (CCMP), sowie der Spurenelementmischung und der f/2 Vitamine für *N. muscorum*.

DY-V Medium		Spurenelemente	
$2,03 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	$1,39 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
$4,02 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	KCl	$1,01 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
$2,51 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	NH_4Cl	$3,36 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	CoSO_4
$1,18 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	NaNO_3	$8,27 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
$7,06 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	β -Glycerophosphat	$1,09 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	Na_3VO_4
$1,29 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	H_3BO_3	$1,55 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	H_2SeO_3
$2,15 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	f/2 Vitamine	
$3,70 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$8,73 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$	Vitamin B ₁₂
$6,76 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	$4,49 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$	Biotin
$1,02 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	MES	$6,24 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	Thiamin · HCl
1 mL L^{-1}	Spurenelemente		
$500 \mu\text{L L}^{-1}$	f/2 Vitamine		
pH 6,8	mit NaOH einstellen		

4.1.5 *Cyanophora paradoxa* (*C. paradoxa*)

Das Wachstum der Glaucophyte *C. paradoxa* (SAG 29.80M) ist noch langsamer als das von *N. muscorum*. Die Ernte erfolgt hier nach ca. vier Wochen. Die Kultivierung sowie das Kulturmedium ist identisch zu *N. muscorum*.

4.2 Aufschluss der Organismen und Isolierung der Thylakoide

4.2.1 *C. reinhardtii*

Die *C. reinhardtii* Algenkultur wird in GS-3-Zentrifugenbecher überführt und bei 4°C sowie $2700 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Das Sediment enthält die konzentrierten Zellen, und der nahezu farblose Überstand, das Anzuchtmedium, wird verworfen. Das Pellet wird in 5 mL

Aufschlusspuffer (siehe Tabelle 4.6) resuspendiert und zum doppelten Volumen an Glaskugeln (10 mL, Ø 425 – 600 µm) in ein SS-34-Zentrifugenröhrchen gegeben. Der mechanische Aufschluss der Algenzellen erfolgt durch einminütiges starkes Schütteln des Suspensions-Glaskugeln-Gemisches auf einem Vortexer (maximale Leistung). Mit Hilfe einer schräg abgeschnittenen, dünnen Pasteur-Pipette saugt man die Algensuspension ab und überführt diese in ein neues SS-34-Röhrchen. Mit 20 mL Aufschlusspuffer werden Suspensionsreste abschließend aus den Glaskugeln herausgewaschen.

Tabelle 4.6: Zusammensetzung des Aufschlusspuffers für *C. reinhardtii*.

Aufschlusspuffer	
0,25 mol L ⁻¹	D-Sorbit
1 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	MnCl ₂ · 4 H ₂ O
1 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
4 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Tris
pH 7,0	mit HCl einstellen
1 µL mL ⁻¹	Protease-Inhibitor-Cocktail (PIC)
0,01 % (w/v)	BSA
1 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	DTT (frisch zugeben)

Zur Gewinnung der Chloroplasten aus dem Organellengemisch muss zweimal je für 3 min bei 2000 × g und 4 °C zentrifugiert werden. Die Sedimente enthalten die Chloroplasten welche mit wenig Aufschlusspuffer resuspendiert, vereinigt und mit 10 % (w/v) Glycerin versetzt werden. Als Maß für die Proteinkonzentration in der Chloroplastensuspension wird eine Chlorophyllbestimmung durchgeführt. Hierzu verdünnt man 40 µL Chloroplastensuspension in 10 mL 80 % (v/v) Aceton (Verdünnungsfaktor 250). Spektralphotometrisch wird die Absorption des Filtrats bei λ = 664 nm und λ = 647 nm gemessen (Absorptionsmaxima Chlorophyll *a* / Chlorophyll *b*). Nach Porra *et al.* berechnet sich die Chlorophyllkonzentration mit folgenden Formeln^[43] und muss mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor (VF) multipliziert werden.

$$c(\text{Chl } a + b) [\text{mM}] = 19,54 \cdot (A_{647 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) + 8,29 \cdot (A_{664 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) \cdot \text{VF} \quad (4.1)$$

$$c(\text{Chl } a + b) [\mu\text{g mL}^{-1}] = 17,76 \cdot (A_{647 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) + 7,34 \cdot (A_{664 \text{ nm}} - A_{750 \text{ nm}}) \cdot \text{VF} \quad (4.2)$$

Zur Lagerung friert man die Chloroplastensuspension in flüssigem Stickstoff ein und bewahrt die Aliquots bei –80 °C auf.

Der Überstand aus der Chloroplastenisolierung enthält Mitochondrien, die mit Chloroplasten verunreinigt sind. Zur Abtrennung der Mitochondrien zentrifugiert man den aus der Chloro-

plastenisolierung erhaltenen Überstand zunächst zweimal je für 3 min bei $2000 \times g$ und 4°C , um den Anteil an Chloroplasten hierin zu reduzieren. Die Sedimente werden verworfen, und der Mitochondrien-enhaltende Überstand wird eine halbe Stunde bei $10000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Nach Resuspendieren in wenig Aufschlusspuffer und Versetzen mit 10 % (w/v) Glycerin, erfolgt die Lagerung der in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Aliquots bei -80°C . Für die Mitochondriensuspension errechnet man ebenfalls wie oben beschrieben die Chlorophyllkonzentration, um ein Maß für die Kontamination an Chloroplasten in der Mitochondrienfraktion zu haben.

4.2.2 *E. gracilis*

Die Zellernte von *E. gracilis* erfolgt durch fünfminütige Zentrifugation (GS-3-Rotor) bei $2000 \times g$ und 4°C . Zur Reinigung des Zellsedimentes resuspendiert man die Algen mit 20 mL Waschpuffer und zentrifugiert bei $3000 \times g$ für 5 min im SS-34-Rotor. Durch die Aufnahme der Pellets in 4 mL Waschpuffer mit Trypsin (Sigma Type II-S aus der Bauchspeicheldrüse vom Schwein, $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ Waschpuffer) pro SS-34-Röhrchen wird das Andauen der proteinreichen Pellikula, die der Plasmamembran bei *E. gracilis* aufgelagert ist, eingeleitet. Unter dem Mikroskop lässt sich das Andauen der Pellikula über die Sphäroblastenbildung verfolgen. Nach einer 45 minütigen Inkubation unter langsamem Rühren im Eisbad, führt die Zugabe von 10 mL Waschpuffer mit Trypsininhibitor (Sigma Type II-O aus Hühnereiweiß, 2 mg mL^{-1} Waschpuffer) je Röhrchen zur Beendigung des Andauprozesses. Zur Abtrennung des Trypsins von den *E. gracilis*-Zellen ist ein Zentrifugationsschritt erforderlich ($2000 \times g$, 5 min, 4°C). Der eigentliche Zellaufschluss erfolgt nun mechanisch mit Glaskugeln ($\varnothing 425 - 600 \mu\text{m}$). Man resuspendiert das Sediment in 5 mL Aufschlusspuffer, gibt diese Suspension auf 10 mL Glaskugeln und schüttelt eine Minute auf dem Vortexer.

Tabelle 4.7: Zusammensetzung des Waschpuffers, sowie des Aufschlusspuffers für *E. gracilis*.

Waschpuffer		Aufschlusspuffer	
$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	KH_2PO_4	$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
pH 7,0	mit KOH einstellen	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
		$0,25 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit
		pH 7,0	einstellen
		$1 \mu\text{L mL}^{-1}$	PIC

Die aufgeschlossenen Zellen werden mit einer schräg abgeschnittenen Pasteur-Pipette abgesaugt und in ein neues Röhrchen überführt. Abschließend erfolgt durch Zugabe von 15 mL Aufschlusspuffer zu den Glaskugeln eine Spülung dieser. Ein fünfminütiger Zentrifugationsschritt bei $150 \times g$ trennt Zelltrümmer sowie nicht aufgeschlossene Zellen ab^[44]. Das Sediment wird verworfen und der Überstand zur Isolierung der Chloroplasten zweimal je 5 min bei $1000 \times g$ im SS-34-Rotor zentrifugiert. Die im Sediment befindlichen Chloroplasten werden mit wenig

Aufschlusspuffer resuspendiert und mit 10 % (w/v) Glycerin versetzt. Die spektralphotometrische Messung der Absorption zur Ermittlung der Chlorophyllkonzentration erfolgt wie bereits bei *C. reinhardtii* beschrieben (Abschnitt 4.2.1 und Formeln 4.1, 4.2). Die Lagerung der in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Aliquots erfolgt bei -80°C . Eine abschließende Zentrifugation des erhaltenen Überstands nach der Chloroplastenisolierung für 30 min bei $10000 \times g$ und 4°C führt zur Sedimentierung der Mitochondrien, welche in einer minimalen Menge an Aufschlusspuffer aufgenommen werden. Nach Versetzen mit 10 % (w/v) Glycerin, Bestimmung der Chlorophyllkonzentration (als Maß der Chloroplastenverunreinigung) und Einfrieren der Aliquots in flüssigem Stickstoff, erfolgt die Lagerung bei -80°C .

4.2.3 *A. longa*

Die Isolierung der *A. longa*-Zellen sowie deren Aufschluss erfolgt in analoger Weise zu *E. gracilis* (Abschnitt 4.2.2). Da es sich bei *A. longa* um eine farblose Verwandte von *E. gracilis* handelt, werden hier keine Chloroplasten, sondern nur Mitochondrien isoliert. Dementsprechend muss hier eine Proteinbestimmung, keine Chlorophyllbestimmung, zur Berechnung der Konzentration an Mitochondrien herangezogen werden.

4.2.4 *N. muscorum*

Zur Ernte des Cyanobakteriums *N. muscorum* werden die Zellen für fünf Minuten bei 4°C und $4000 \times g$ im GS-3-Rotor zentrifugiert. Die einzelnen Sedimente nimmt man in jeweils 20 mL Waschpuffer auf und überführt die Suspension in SS-34-Röhrchen. Es folgt ein erneuter Zentrifugationsschritt bei $4000 \times g$ (5 min, 4°C). Um einen nahezu vollständigen Zellaufschluss zu gewährleisten, muss der Aufschlusspuffer mit DNase I versetzt werden ($4 \mu\text{g DNase I mL}^{-1}$ Aufschlusspuffer). Die Resuspendierung der Sedimente erfolgt in jeweils 5 mL Aufschlusspuffer (mit DNase I).

Tabelle 4.8: Zusammensetzung des Resuspensions- und Aufschlusspuffers für *N. muscorum*.

Resuspensionspuffer (2x)		Aufschlusspuffer	
$4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	HEPES	$0,5 \text{ mL mL}^{-1}$	Resuspensionspuffer (2x)
$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	$1 \mu\text{L mL}^{-1}$	PIC
pH 8,0	einstellen		

Tabelle 4.9: Zusammensetzung des Wasch- und Lagerpuffers für *N. muscorum*.

Waschpuffer		Lagerpuffer	
$0,5 \text{ mL mL}^{-1}$	Resuspensionspuffer (2x)	$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	MES
$0,4 \text{ mol L}^{-1}$	Saccharose	$0,5 \text{ mol L}^{-1}$	D-Mannit
		pH 6,0	einstellen

Diese Suspension wird auf 10 mL Glasperlen (\varnothing 425 – 600 μm) gegeben, und die Zellen durch vier Zyklen 2 min starkes Schütteln auf dem Vortexer und einminütiges Kühlen auf Eis aufgeschlossen^[45]. Nach Absaugen der Suspension mit einer langen, schräg abgeschnittenen Pasteur-Pipette, wäscht man abschließend die Glaskugeln mit 15 mL Aufschlusspuffer. Zur Abtrennung von Glaskugeln, Zelltrümmern sowie nicht aufgeschlossenen Zellen wird 5 min bei $1500 \times g$ zentrifugiert. Zum Sedimentieren der Membranen (Thylakoid-, Plasma-, und Außenmembran) ist ein Zentrifugationsschritt bei $43000 \times g$ für 45 min (SS-34-Rotor) erforderlich. Dieser Schritt muss bei $150000 \times g$ (30 min, Ti-70-Rotor) wiederholt werden, wenn der Überstand nach der ersten Zentrifugation noch deutlich blau-grün gefärbt ist. Die pelletierten Membranen nimmt man in wenig Lagerpuffer auf, versetzt sie mit 10 % (w/v) Glycerin und bewahrt die Aliquots nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C auf. Als Maß für die Konzentration der Probe kann die Chlorophyllkonzentration herangezogen werden (siehe Abschnitt 4.2.1).

4.2.5 *C. paradoxa*

Der erste Schritt der Ernte der Zellen ist ein Zentrifugationsschritt bei $5000 \times g$ für 5 min (GS-3-Rotor, 4°C). Die Zellsedimente werden in jeweils 20 mL HEMS-Puffer aufgenommen und erneut zentrifugiert ($5000 \times g$, 5 min, SS-34-Rotor, 4°C). *C. paradoxa* besitzt Cyanellen, die von einer Peptidoglycan-Wand umgeben sind. Um diese Barriere osmotisch aufzubrechen, resuspendiert man die Pellets mit jeweils 20 mL Schockpuffer und inkubiert 10 min auf Eis. Anschließend erfolgt ein Zentrifugationsschritt, um die Cyanellen zu sedimentieren ($5000 \times g$, 5 min).

Tabelle 4.10: Zusammensetzung des HEM- und Aufschlusspuffers für *C. paradoxa*.

HEM-Puffer (2x)		Aufschlusspuffer	
0,1 mol L ⁻¹	HEPES	25 % (v/v)	Glycerin
$4 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹	EGTA	$1 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹	CaCl ₂ · 2 H ₂ O
$2 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹	NaCl	0,5 mL mL ⁻¹	HEM (2x)
$2 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	1 μL mL ⁻¹	PIC
pH 7,5	mit NaOH einstellen	pH 7,0	einstellen

Tabelle 4.11: Zusammensetzung des HEMS- und Schockpuffers für *C. paradoxa*.

HEMS-Puffer		Schockpuffer	
0,5 mL mL ⁻¹	HEM (2x)	0,5 mL mL ⁻¹	HEM (2x)
0,5 mol L ⁻¹	Saccharose		

Hieran schließt sich der mechanische Aufschluss der in 5 mL Aufschlusspuffer aufgenommenen Cyanellen-Pellets mit jeweils 10 mL Glaskugeln an (\varnothing 425 – 600 μm). Hierbei wird acht Mal für 30 s stark geschüttelt und 90 s lang auf Eis gekühlt. Mit Hilfe einer dünnen, schräg abgeschnittenen Pasteur-Pipette saugt man die aufgeschlossenen Cyanellen ab und überführt

die Suspension in ein neues SS-34-Röhrchen. Suspensionsreste werden mit 15 mL Aufschlusspuffer aus den Glaskugeln gespült. Zur Beseitigung von Glaskugeln, Zelltrümmern und nicht aufgeschlossenem Material erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei $5000 \times g$ (10 min, 4°C). Die Sedimentierung der *C. paradoxa*-Thylakoide erfolgt per Zentrifugation des Überstandes bei $35000 \times g$ für 30 min^[46]. Die in wenig Aufschlusspuffer resuspendierten Membranen werden mit 10 % (w/v) Glycerin versetzt, die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und tiefgekühlt gelagert (-80°C). Wie in Abschnitt 4.2.1 eignet sich auch hier eine Chlorophyllbestimmung als Maß für die in der Probe enthaltene Proteinmenge.

4.3 Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Analyse von Membranproteinen müssen diese zunächst mit Detergenzien aus der Lipiddoppelschicht in Lösung gebracht werden. Detergenzien sind amphiphile Moleküle, d. h. sie enthalten als Strukturmerkmale eine hydrophile Kopfgruppe (polar, ionisch oder nicht-ionisch) und einen hydrophoben Schwanz (Alkylkette oder Steroidgerüst). In Tabelle 4.12 sind die Strukturen, sowie die kritischen micellaren Konzentrationen (CMC) einiger gängiger Detergenzien aufgelistet.

Tabelle 4.12: Molmassen, kritische micellare Konzentrationen (bei $20 - 25^\circ\text{C}$) und Strukturen gängiger Detergenzien^[47,48] (Strukturformeln von <http://www.sigmaaldrich.com>) .

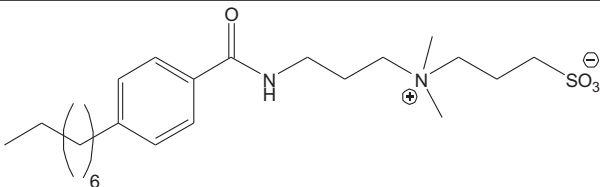
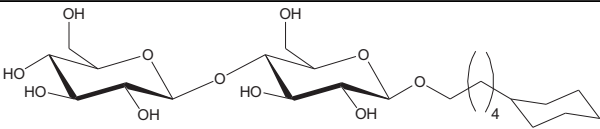
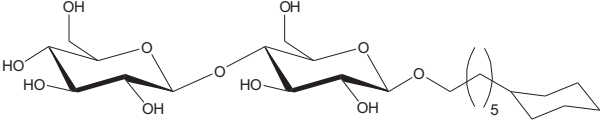
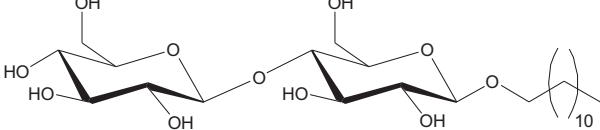
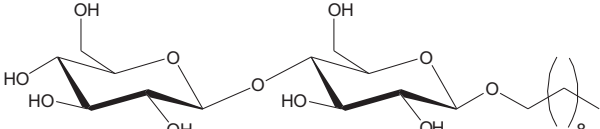
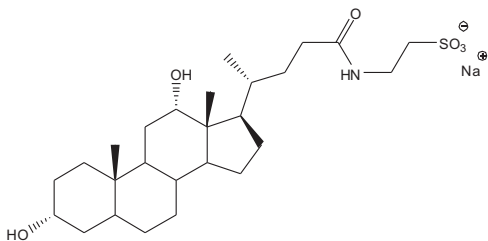
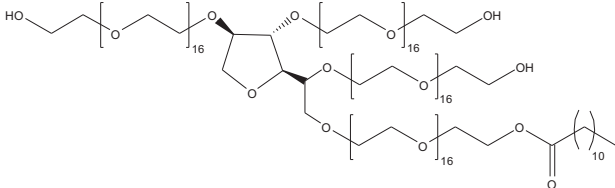
Name / Molmasse	CMC [mM]	Struktur
4- <i>n</i> -Octylbenzoylamidopropyl-dimethylammonio-sulfobetain (ASB-C8 ϕ) M = $440,6 \text{ g mol}^{-1}$	nicht bestimmt	
5-Cyclohexyl-1-pentyl- β -D-maltosid (Cymal 5) M = $494,6 \text{ g mol}^{-1}$	2,4 - 5	
6-Cyclohexyl-1-hexyl- β -D-maltosid (Cymal 6) M = $508,6 \text{ g mol}^{-1}$	0,56	
<i>n</i> -Dodecyl- β -D-maltosid (DDM) M = $510,6 \text{ g mol}^{-1}$	0,14	
<i>n</i> -Decyl- β -D-maltopyranosid (DM) M = $482,6 \text{ g mol}^{-1}$	1,4	

Tabelle 4.12: (Fortsetzung).

Name / Molmasse	CMC [mM]	Struktur
Dodecanoyl-D-saccharose (DDS) $M = 524,6 \text{ g mol}^{-1}$	0,3	
Decanoyl-D-saccharose (DS) $M = 496,6 \text{ g mol}^{-1}$	2,5	
Digitonin $M = 1229,3 \text{ g mol}^{-1}$	<0,5	
Triton X-100 $M^a = 650 \text{ g mol}^{-1}$	0,21	
Natriumdodecylsulfat (SDS) $M = 288,4 \text{ g mol}^{-1}$	7 - 10	
Natriumdesoxycholat (DOC) $M = 414,6 \text{ g mol}^{-1}$	2 - 6	

^a mittlere Molmasse

Tabelle 4.12: (Fortsetzung).

Name / Molmasse	CMC [mM]	Struktur
Natriumtaurodesoxy- cholat (TDOC) $M = 521,7 \text{ g mol}^{-1}$	1 - 4	
Polyoxyethylen(20)- sorbitan-mono- laurat (Tween® 20) $M = 1227,7 \text{ g mol}^{-1}$	0,059	

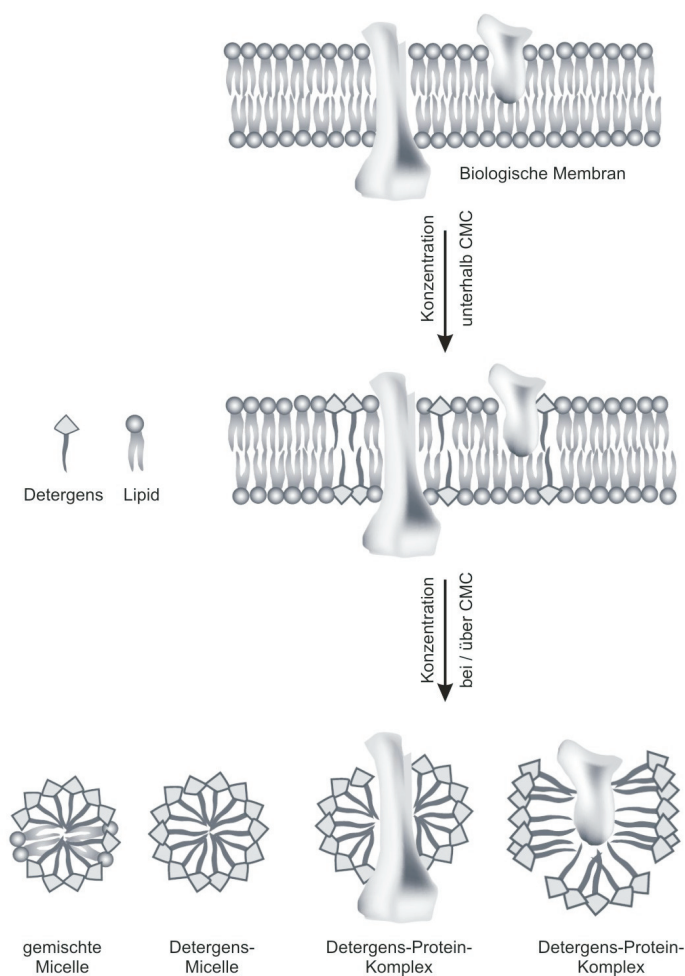


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung einer Solubilisierung. Unterhalb der kritischen micellaren Konzentration (CMC) lagern sich nur einige wenige Detergensmoleküle in die biologische Membran ein. Erst genau bei oder oberhalb der CMC bilden sich Micellen aus Detergensmolekülen und gehen als Protein-Detergens-Komplexe in Lösung. (Modifiziert nach ^[47]).

Oberhalb einer gewissen Konzentration an Detergens, der sogenannten kritischen micellaren Konzentration (CMC), aggregieren die Moleküle zu Micellen. Die hydrophilen Kopfgruppen zeigen hierbei nach außen und können z. B. mit dem wässrigen Medium wechselwirken, wohingegen die hydrophoben Schwänze ins Innere der Micelle zeigen. Die CMC ist für jedes Detergens spezifisch und hängt zusätzlich von Faktoren wie Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert sowie Konzentrationen nicht-ionischer Stoffe wie Alkohole oder Harnstoff ab. Bei der Solubilisierung von Membranproteinen wechselwirken die lipophilen Teile der Detergenzien mit den hydrophoben Bereichen der Proteine, sodass es schließlich zur Bildung eines Detergens-Protein-Komplexes kommt, der im wässrigen Medium löslich ist. Milde Detergenzien wie z. B. Digitonin oder DDM sind in der Lage, Membranproteinkomplexe in ihrer nativen Form ohne Denaturierung zu solubilisieren. Detergenzien wie SDS dagegen zerstören Protein-Protein-Wechselwirkungen und denaturieren diese. Abbildung 4.1 zeigt schematisch verschiedene Stadien während einer Solubilisierung.

4.3.1 Solubilisierung von Thylakoiden

Die Solubilisierung von Membranen der verschiedenen Organismen erfolgt bei einer Konzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ bezogen auf Chl *a* und *b*. Für *A. longa* wird die tatsächliche Proteinkonzentration für die Solubilisierungsansätze herangezogen, welche zwischen $0,6 - 0,9 \text{ mg mL}^{-1}$ liegt. Die Detergenskonzentration beträgt für chlorophyllhaltige Organismen zwischen 1 und 1,5 % (w/v), bei *A. longa* werden niedrigere Detergenskonzentrationen eingesetzt (0,5 - 0,7 % (w/v)). Als Solubilisierungspuffer eignet sich für *C. reinhardtii* Puffer-O (2x) mit MnCl_2 , für alle anderen Organismen Puffer-O (2x) mit NaCl. Die genaue Zusammensetzung beider Puffer ist in Tabelle 4.13 aufgelistet.

Tabelle 4.13: Zusammensetzung des Solubilisierungspuffers O (2x) mit MnCl_2 für *C. reinhardtii* bzw. mit NaCl für alle anderen Organismen.

Puffer-O (2x) mit MnCl_2		Puffer-O (2x) mit NaCl	
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	NaCl
$4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin	$4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
$0,5 \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocapronsäure	$0,5 \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocapronsäure
20 % (w/v)	Glycerin	20 % (w/v)	Glycerin
pH 8,0	mit NaOH einstellen	pH 8,0	mit NaOH einstellen
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	DTT	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	DTT

Nach Zusammenpipettieren und gutem Mischen des Solubilisierungsansatzes erfolgt eine 30 minütige Inkubation im Kühlschrank bei 4°C . Während dieser Inkubation mischt man die Probe mehrfach. Nach Abschluss der Inkubationszeit werden Membrantrümmer sowie nicht solubiliertes Material durch Zentrifugation abgetrennt ($20000 \times g$, 20 min, F45-30-11-Rotor Eppen-

dorf oder # 7593-Rotor Heraeus). Tabelle 4.14 zeigt beispielhaft einen Solubilisierungsansatz mit einem Gesamtvolumen von 1 mL, einer Digitoninkonzentration von 1 % (w/v), sowie einer Chlorophyllkonzentration der entsprechenden Thylakoidmembran von 2 mg mL⁻¹.

Tabelle 4.14: Beispielhafter Solubilisierungsansatz für *C. reinhardtii*. Das Gesamtvolumen beträgt 1 mL, die Digitoninkonzentration 1 % (w/v) und die Ausgangschlorophyllkonzentration der entsprechenden Thylakoidmembran 2 mg mL⁻¹.

Menge	Komponente
200 µL	Thylakoidmembran
100 µL	Digitonin (10 % (w/v) Stammlösung)
500 µL	Puffer-O (2x) mit MnCl ₂
200 µL	bidest. H ₂ O

4.4 Methoden der Dichtegradientenzentrifugation

Organellen aus Zellextrakten sowie solubilisierter Proteingemische lassen sich mit Hilfe von Dichtegradientenzentrifugationen reinigen. Entscheidend ist hierbei die Art des Gradienten, linearer oder Stufengradient, sowie die Wahl des Gradientenmediums. Für Proteingemische verwendet man Gradienten aus verschiedenen konzentrierten Saccharoselösungen. Zur Aufreinigung von Organellen aus Zellextrakten müssen osmotische Effekte beachtet werden. Hierfür geeignete Gradientenmedien mit niedriger Osmolarität, die in dieser Arbeit eingesetzt werden, sind kolloidale polymerbeschichtete Silicakügelchen (Percoll[®]) und Iodixanollösungen (Optiprep[™]). Alle linearen Dichtegradienten werden mit Hilfe eines Gradientenmischers gegossen. Zur Unterschichtung des Gradienten wird die niederprozentige Gradientenlösung in die auslassseitige Kammer gefüllt, die hochprozentige in die andere Kammer des Gradientenmischers. Der Gradient wird über eine Kanüle, deren Öffnung sich am Boden des Röhrchens befindet, in ein Zentrifugenröhrchen gegossen.

4.4.1 Saccharose-Dichtegradienten

Für lineare Gradienten werden Saccharosekonzentrationen beginnend mit 15 % (w/v) und abschließend mit 55 % (w/v) eingesetzt. Bei Stufengradienten hängt die Wahl des Konzentrationsbereichs an Saccharose von der Anzahl der eingesetzten Stufen ab. Aufgrund der hohen Osmolarität der Saccharose eignet sich diese Art der Dichtegradientenzentrifugation besser für Proteine als zur Aufreinigung von Organellengemischen. Die Solubilisierung der Proteine wird wie bereits in Abschnitt 4.3.1 beschrieben durchgeführt. Allein die Glycerinkonzentration im Solubilisierungspuffer (Puffer-O (2x), siehe Tabelle 4.13) wird von 20 auf 5 % (w/v) reduziert, da andernfalls die aufzutragende Probe vor der Zentrifugation in die Gradientenlösung einsinken kann. Zur Stabilisierung von Protein(super)komplexen während der Zentrifugation enthält die Gradientenlösung 0,2 % (w/v) des der vorangehenden Solubilisierung entsprechenden Detergens. Die Zusammensetzung der Gradientenpuffer für *C. reinhardtii* und alle anderen Organismen ist in folgender Tabelle dargestellt. Darunter ist beispielhaft die Zusammensetzung

zweier Gradientenlösungen mit 15 bzw. 55 % (w/v) Saccharose gezeigt. Die Zentrifugation erfolgt im Schwingbecherrotor (SW-41) bei $150000 \times g$ und 4°C für 20 h^[49].

Tabelle 4.15: Zusammensetzung des Gradientenpuffers (4x) mit MnCl_2 für *C. reinhardtii* bzw. mit NaCl für alle anderen Organismen.

Gradientenpuffer (4x) mit MnCl_2		Gradientenpuffer (4x) mit NaCl	
$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	$4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	NaCl
$8 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin	$8 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
1 mol L^{-1}	6-Aminocapronsäure	1 mol L^{-1}	6-Aminocapronsäure
pH 8,0	mit NaOH einstellen	pH 8,0	mit NaOH einstellen
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	DTT	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	DTT

Tabelle 4.16: Beispielhafte Zusammensetzung von jeweils 50 mL Gradientenlösung mit 15 bzw. 55 % (w/v) Saccharose.

Gradientenlösung 15 %		Gradientenlösung 55 %	
12,5 mL	Gradientenpuffer (4x)	12,5 mL	Gradientenpuffer (4x)
7,5 g	Saccharose	27,5 g	Saccharose
1 mL	Detergens (10 % (w/v))	1 mL	Detergens (10 % (w/v))
mit bidest. H_2O auf 50 mL auffüllen		mit bidest. H_2O auf 50 mL auffüllen	

4.4.2 Percoll®-Dichtegradienten

Percoll®-Dichtegradienten werden sowohl kontinuierlich gegossen, als auch mit diskreten Stufen eingesetzt. Aufgrund der Isoosmolarität von Percoll®-Dichtegradienten eignen sich diese zur Auftrennung von Organellen. Bei Percoll®-Dichtegradienten kann auf das Gießen eines kontinuierlichen Gradienten verzichtet werden, da sich ein solcher während der Zentrifugation ausbildet. Zur weiteren Analyse der erhaltenen Fraktionen nach der Zentrifugation muss das Gradientenmedium entfernt werden, da dieses beispielsweise Aktivitätstests stören kann. Hierzu werden 100 μL der interessierenden Fraktion mit 1,2 mL Percoll®-Gradientenpuffer (2x), siehe Tabelle 4.18, vermischt und mit 5 % Glycerin versetzt. Der anschließende Zentrifugationsschritt erfolgt für 10 min bei $10000 \times g$. Das resultierende Sediment wird in einer minimalen Menge (100 μL) Gradientenpuffer (2x) resuspendiert, den Überstand verwirft man. Für gelelektrophoretische Untersuchungen der gereinigten Fraktionen wird eine Solubilisierung der Thylakoidmembranen entsprechend der in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Methode durchgeführt. Im Folgenden sind alle Lösungen und Puffer für die verschiedenen kontinuierlichen und Stufengradienten gezeigt.

4.4.2.1 Kontinuierlich gegossener Dichtegradient

Zwei SW-28-Zentrifugenröhrchen werden mit jeweils 34 mL Percoll®-Gradientenlösung (10 bis 80 %) über eine Peristaltikpumpe mit 8 U min^{-1} und 1,85 mm Schlauchdurchmesser befüllt. Die Gradienten werden jeweils mit 3 mL unverdünntem Organellengemisch beladen und eine halbe Stunde bei $6000 \times g$ im SW-28-Schwingbecherrotor zentrifugiert^[50]. Anschließend erfolgt die Fraktionierung der Gradienten durch vorsichtiges Absaugen mit einer Glaspipette.

Tabelle 4.17: Zusammensetzung des Percoll®-Gradientenpuffers (5x) sowie der Gradientenlösungen, jeweils 35 mL, für einen kontinuierlichen Gradienten (10 bis 80 %)^[50].

Percoll®-Gradientenpuffer (5x)		Gradientenlösung 10 %	
$2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	3,5 mL	Percoll®
0,1 mol L ⁻¹	Tricin	7 mL	Gradientenpuffer (5x)
0,25 mol L ⁻¹	6-Aminocaprinsäure	mit bidest. H ₂ O auf 35 mL auffüllen	
pH 8,0	einstellen	Gradientenlösung 80 %	
$1,25 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	DTT	28 mL	Percoll®
		7 mL	Gradientenpuffer (5x)

4.4.2.2 Kontinuierlicher Dichtegradient per Zentrifugation

Um einen Percoll®-Dichtegradienten per Zentrifugation zu generieren, mischt man gleiche Teile Gradientenpuffer (2x) (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.18) und Percoll® (100 %) in einem SS-34-Zentrifugenröhrchen. Es entsteht eine 50 %ige Lösung an Percoll®, die 1,5 h bei $23700 \times g$ im HB-4-Schwingbecherrotor zentrifugiert wird, um den Gradienten zu generieren^[51]. Anschließend belädt man die Gradienten (32 mL) mit jeweils 3,5 mL Suspensionsgemisch aus Chloroplasten und Mitochondrien und zentrifugiert eine Stunde bei gleicher relativer Zentrifugalbeschleunigung (RZB, $23700 \times g$). Die Fraktionierung erfolgt wie bereits im vorigen Abschnitt beschrieben (4.4.2.1).

Tabelle 4.18: Zusammensetzung des Percoll®-Gradientenpuffers (2x) für einen per Zentrifugation generierten, kontinuierlichen Gradienten^[51].

Percoll®-Gradientenpuffer (2x)	
0,6 mol L ⁻¹	D-Sorbit
$4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	MgCl ₂ · 6 H ₂ O
$5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O
pH 7,6	mit KOH einstellen

4.4.2.2.1 Thylakoidmembran-freie Isolierung von Mitochondrien

Zur Thylakoidmembran-freien Isolierung von Mitochondrien aus einem Organellengemisch wird eine Kombination aus osmotischem Organellenaufschluss und Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation verwendet^[52]. Zunächst nimmt man das Organellengemisch (ca. 4 mg Chloroplasten und Mitochondrien) in 10 mL Breaking-Buffer auf und zentrifugiert 5 min bei $2000 \times g$ und 4°C im SS-34-Zentrifugenrotor. Im Überstand befindliche Mitochondrien und wenig Thylakoide homogenisiert man bei 500 U min^{-1} und fünf Hüben mit einem Teflon-Glas-Homogenisator.

Tabelle 4.19: Zusammensetzung der benötigten Puffer zur Thylakoidmembran-freien Isolierung von Mitochondrien aus einem Organellengemisch^[52].

Breaking-Buffer		Assay-Buffer	
$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	HEPES	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	KCl
$5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	KH_2PO_4
$0,25 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit	$0,25 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit
$4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	L-Cystein	$4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
0,5 % (w/v)	PVP-40	0,1 % (w/v)	BSA
0,1 % (w/v)	BSA	pH 7,2	einstellen
pH 7,2	mit KOH einstellen	Percoll®-Dilution-Buffer (PDB)	
Percoll®-Buffer		$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	KH_2PO_4
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	MOPS	$0,25 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit
20 % (v/v)	Percoll®	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
$0,25 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit	0,1 % (w/v)	BSA
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	pH 7,2	einstellen
0,1 % (w/v)	BSA	PDB mit Protease-Inhibitoren	
0,5 % (w/v)	PVP-40	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	KH_2PO_4
pH 7,2	mit KOH einstellen	$0,25 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit
		$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
		0,1 % (w/v)	BSA
		$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	PMSF
		$5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocaprinsäure

Das Homogenisat wird anschließend zur Abtrennung der Thylakoide für 5 min bei $1500 \times g$ zentrifugiert. Zur Sedimentierung der Rohmitochondrienfraktion zentrifugiert man den Überstand bei $12000 \times g$ für 10 min. Das erhaltene Pellet wird mit Assay-Buffer resuspendiert und mit Percoll®-Buffer auf ein Gesamtvolumen von 30 mL verdünnt. Diese Suspension wird unter den oben beschriebenen Bedingungen mit einem Teflon-Glas-Homogenisator bearbeitet und anschließend für 40 min bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Die nahe des Zentrifugenröhrchenbodens

befindliche Mitochondrienfraktion wird mit etwa 30 mL Percoll®-Dilution-Buffer verdünnt und zentrifugiert ($12000 \times g$, 10 min, 4°C). Nach Wiederholung dieses Waschschruttes erfolgt die Resuspension des Pellets in mit Protease-Inhibitoren versetztem Percoll®-Dilution-Buffer. Die somit gereinigte Mitochondrienfraktion steht nun für weitere biochemische Analysen zur Verfügung. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer kann Tabelle 4.19 entnommen werden.

4.4.2.3 Percoll®-Stufengradienten

Neben kontinuierlichen Dichtegradienten werden Organellengemische auch mit Hilfe von Stufengradienten aufgereinigt. Nach einer Vorschrift von Zerges und Rochaix (1998) ^[53] erfolgt der Einsatz eines zweistufigen Gradienten (45 und 75 %), sowie durch Modifikation dieser Vorschrift eines dreistufigen Gradienten (20, 45 und 65 %). Der hier verwendete Gradientenpuffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.18) unterscheidet sich nur marginal zu dem von Zerges und Rochaix. Nach vorsichtigem Übersichten der einzelnen Gradientenstufen in einem SS-34-Zentrifugenröhrchen wird der Gradient mit 1,3 mL Organellensuspension beladen und 20 min im HB-4-Rotor bei $6000 \times g$ zentrifugiert. An den jeweiligen Phasengrenzen der einzelnen Stufen konzentrieren sich die verschiedenen Bestandteile des Suspensionsgemisches und können somit abgesaugt und fraktioniert werden. Das Pipettierschema für einen dreistufigen Percoll®-Gradienten ist in Tabelle 4.20 dargestellt.

Tabelle 4.20: Pipettierschema eines dreistufigen Percoll®-Dichtegradienten. Jeweils 12 mL der einzelnen Stufen werden vorsichtig in einem SS-34-Zentrifugenröhrchen übereinander geschichtet. Modifiziert nach Zerges und Rochaix (1998) ^[53].

Gradientenstufe	20 %	45 %	65 %
Percoll®	2,4 mL	5,4 mL	7,8 mL
Percoll®-Gradientenpuffer	6 mL (2x)	6 mL (2x)	4,2 mL (2,86x)
20 und 45 %-Stufe mit bidest. H ₂ O auf 12 mL auffüllen			

4.4.3 Optiprep™-Dichtegradienten

Optiprep™ ist eine sterile 60 %ige Lösung von Iodixanol in Wasser. Optiprep™ hat eine geringe Osmolarität und eignet sich somit ebenfalls zur Aufreinigung von Organellengemischen aus Zellextrakten. In Abbildung 4.2 ist die Struktur von Iodixanol gezeigt.

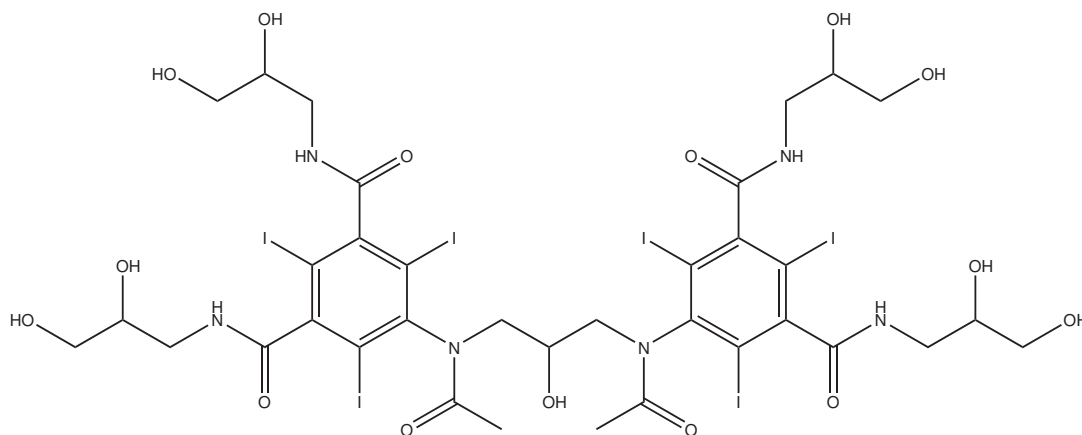


Abbildung 4.2: Strukturformel von Iodixanol, das als 60 %ige Lösung in Wasser als Optiprep™-Dichtegradientenmedium eingesetzt wird (Strukturformel von <http://www.sigmaaldrich.com>).

Tabelle 4.21: Zusammensetzung des Suspensions- und Arbeitsmediums für Optiprep™-Dichtegradienten.

Suspensionsmedium	Arbeitsmedium
8,75 % (w/v) D-Sorbit	12,25 % (w/v) D-Sorbit
$1 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹ Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O	$3 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹ Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O
$1 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹ Tris	$3 \cdot 10^{-2}$ mol L ⁻¹ Tris
pH 7,4 mit HCl einstellen	40 % (w/v) Iodixanol
	pH 7,4 mit HCl einstellen

Es werden zwei Arten kontinuierlicher Gradienten eingesetzt. Zum einen ein linearer Gradient von 15 bis 40 % auf den das Organellengemisch aufgetragen wird, zum anderen wird ein sedimentiertes Organellengemisch mit 40 % Optiprep™ resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen vorgelegt, auf das wiederum ein kontinuierlicher Gradient von 15 bis 35 % gegossen wird. Es werden jeweils 2 mL Probensuspension (unverdünnt, ca. 2 – 3 mg mL⁻¹ Chlorophyllkonzentration) mit 34 mL Gradientenlösung in SS-34-Zentrifugenröhrchen eingesetzt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Lösungen ist in Tabelle 4.21 dargestellt. Die 15 %ige Lösung für die kontinuierlichen Gradienten erhält man durch Mischen von 6,4 mL Arbeitsmedium mit 10,6 mL Suspensionsmedium. Diese 17 mL werden im Gradientenmischer mit 17 mL Arbeitsmedium (40 % Iodixanol) zu einem kontinuierlichen Gradienten gegossen. Für die mit Organellen vermischte und im Zentrifugenröhrchen vorgelegte 40 % Stufe sedimentiert man 2 mL Suspension (10 min bei 20000 × g) und resuspendiert das Pellet anschließend in 2 mL Arbeitsmedium. Zur Herstellung der 35 %igen Lösung pipettiert man 14,9 mL Arbeitsme-

dium mit 2,1 mL Suspensionsmedium. 17 mL der 15 % Lösung werden mit 17 mL der 35 % Lösung als linearer Gradient auf die die Organellen enthaltende 40 %-Stufe gegossen. Die Gradienten werden jeweils für 3 h bei 4 °C und $26000 \times g$ im HB-4-Rotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation werden die Gradienten für andere Analysen fraktioniert.

4.5 Probenvorbereitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Neben biochemischen Methoden zur Charakterisierung von Protein(super)komplexen werden auch elektronenmikroskopische Methoden für strukturelle Untersuchungen eingesetzt. Es werden zwei verschiedene Arten der Elektronenmikroskopie (EM) angewandt. Mit Hilfe der Cryo-Elektronen-Tomographie können beispielsweise verschiedene Ebenen innerhalb von Organell-Membranen und darin enthaltene Proteinkomplexe abgebildet werden. Zur strukturellen Abbildung von Proteinsuperkomplexen eignet sich die Methode der Einzelpartikel-EM. Hierbei wird aus einer sehr großen Anzahl von Einzelbildern aus verschiedenen Betrachtungswinkeln die Struktur des betrachteten Partikels berechnet. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen werden am Max-Planck-Institut für Biophysik in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Werner Kühlbrandt in Frankfurt am Main durchgeführt. Die Probenvorbereitung für die jeweiligen elektronenmikroskopischen Messungen werden im folgenden Abschnitt beschrieben. Da die eigentlichen EM-Messungen nicht selbst durchgeführt werden, sei an dieser Stelle auf die Methodenbeschreibungen in anderen Arbeiten verwiesen^[34,54].

4.5.1 Trennung und Entstapelung von Thylakoiden aus Chloroplasten

Mit Hilfe der Methode der Cryo-Elektronen-Tomographie soll versucht werden, das ATP-Synthase-Dimer aus Chloroplasten näher zu charakterisieren. Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen müssen die Chloroplastenproben wie folgt beschrieben vorbereitet werden. Nach einer Vorschrift von Kyle *et al.* (1984)^[55] werden die Granastapel in Chloroplasten von Stromathylakoiden getrennt und entstapelt. Hierzu erfolgt zunächst eine kurze Solubilisierung der Chloroplastenmembran mit Digitonin in Resuspensionspuffer (Thylakoidkonzentration $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$) auf Eis, die nach 2 min durch Zugabe von Resuspensionspuffer gestoppt wird (10-fache Verdünnung). Durch Differentialzentrifugation können anschließend gestapelte und entstapelte Thylakoide der Chloroplasten erhalten werden. Ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei $1000 \times g$ trennt nicht solubilisiertes Material ab. Das Pellet nach 30 min bei $10000 \times g$ enthält gestapelte Grana. Durch Zentrifugation des Überstands bei $40000 \times g$ (30 min) sedimentiert man einen Zwischenbereich, der mit entstapelten Granalamellen angereichert ist. Ein abschließender Zentrifugationsschritt ($144000 \times g$, 60 min) pelletiert Stromalamellen. In Tabelle 4.22 ist die Zusammensetzung des Resuspensionspuffers, sowie ein Pipettierschema für die Solubilisierung der Chloroplastenmembran gezeigt. Die ersten drei Zentrifugationsschritte ($1000 \times g$, $10000 \times g$ und $40000 \times g$) werden im SS-34-Zentrifugenrotor durchgeführt, die Ultrazentrifugation bei $144000 \times g$ im Ti-70-Rotor. Die jeweiligen Sedimente werden in wenig Resuspensionspuffer aufgenommen (500 μL Granastapel, jeweils 300 μL Zwischenbereich

und Stromalamellen) und weiteren biochemischen sowie elektronenmikroskopischen Analysen unterzogen.

Tabelle 4.22: Zusammensetzung des Resuspensionspuffers zur Trennung von Grana- und Stromalamellen aus Chloroplasten^[55], sowie das Pipettierschema für einen 3 mL Solubilisierungsansatz der Chloroplastenmembran mit Resuspensionspuffer.

Resuspensionspuffer (RP)		Pipettierschema Solubilisierung	
$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin	Chloropyllkonzentration	2 mg mL^{-1}
$0,1 \text{ mol L}^{-1}$	D-Sorbit	Konzentration Digitonin	0,4 % (w/v)
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	NaCl	Konzentration Solubilisat	$0,2 \text{ mg mL}^{-1}$
$5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	Chloroplastensuspension	$300 \text{ }\mu\text{L}$
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	NaF	Digitonin (10 % (w/v))	$120 \text{ }\mu\text{L}$
pH 7,8	einstellen	Resuspensionspuffer	2,58 mL
		Stoppen durch Zugabe von 27 mL RP	

4.5.2 Lyse von Chloroplasten

Neben dem Aufschluss von Chloroplasten mit Detergenzien werden für elektronenmikroskopische Untersuchungen auch hypotonische Medien zum osmotischen Aufbrechen von Organellen eingesetzt^[51]. Hieran schließt sich eine Percoll[®]-Dichtegradientenzentrifugation nach der in Abschnitt 4.4.2 beschriebenen Methode an. Um bei der EM störende Substanzen aus der Aufreinigungslösung nach der Percoll[®]-Beseitigung zu entfernen, wird das resultierende Pellet in einem für die EM geeigneten Minimalpuffer resuspendiert. Die Zusammensetzungen des Lyse- und Minimalpuffers können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 4.23: Zusammensetzung des Lyse^[51]- und Minimalpuffers zur elektronenmikroskopischen Analyse von Chloroplasten.

Lyse-Puffer		Minimalpuffer für EM	
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	MOPS	$1,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
$4 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	$2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	NaCl
$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	PMSF	$1 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
$5 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocaprinsäure	pH 7,8	einstellen
pH 7,8	mit NaOH einstellen		

4.6 Ermittlung von Proteinkonzentrationen

4.6.1 Proteinbestimmung mit Roti[®] Nanoquant

Die Proteinbestimmung mit Roti[®] Nanoquant basiert auf der kolorimetrischen Proteinbestimmungsmethode nach Bradford (1976)^[56]. Das Prinzip der Methode beruht auf der Anlagerung

des Farbstoffs Coomassie G-250 (siehe Abbildung 4.7, Seite 47) an hauptsächlich hydrophobe und kationische Seitenketten in Proteinen. Aufgrund dieser Anlagerung erfolgt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von $\lambda = 465 \text{ nm}$ zu $\lambda = 595 \text{ nm}$. Diese Absorptionzunahme bei 595 nm ist in guter Näherung proportional zur Proteinmenge in der Lösung. Laut Hersteller liegt die minimale Empfindlichkeit des Reagens bei 200 ng Protein. Die Durchführung erfolgt nach der mitgelieferten Gebrauchsanweisung von Roti® Nanoquant. Hierzu legt man 200 μL verschiedener BSA-Konzentrationen (1 – 25 μg Gesamtproteinmasse aus 1 mg mL^{-1} Stammlösung) als Standardreihe in Halbmikro-Einwegküvetten vor und mischt mit jeweils 800 μL Roti® Nanoquant Arbeitslösung (5x Konzentrat, Vermischen von 4 Teilen bidest. H_2O mit einem Teil Konzentrat). Nach Messung der BSA-Standardreihe bei 450 nm und 590 nm (Herstellerangabe) erstellt man die Standardgerade durch Auftragung der Proteinmassen gegen den Quotienten der Absorptionen bei 590 nm und 450 nm ($A_{590 \text{ nm}}/A_{450 \text{ nm}}$). Abbildung 4.3 zeigt eine beispielhafte BSA-Standardreihe einer kolorimetrischen Proteinbestimmung mit Roti® Nanoquant.

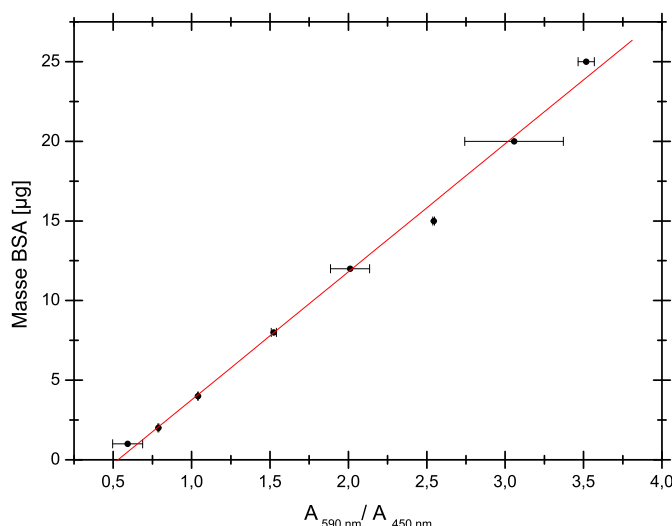


Abbildung 4.3: Typische BSA-Standardreihe einer kolorimetrischen Proteinbestimmung mit Roti® Nanoquant. Aufgetragen ist die Proteinmasse an BSA [μg] gegen den Quotienten der Absorptionen bei 590 nm und 450 nm. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Absorptionswerte der doppelt bestimmten BSA-Verdünnungen (zwei Replikate). Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt hier bei 0,9974.

4.6.2 Proteinbestimmung mit Pyrogallolrot

Eine weitere kolorimetrische Proteinbestimmungsmethode wird mit Pyrogallolrot (siehe Abbildung 4.5) durchgeführt. Hierbei führt die Anlagerung eines Pyrogallolrot-Molybdat-Komplexes an Proteine unter sauren Bedingungen zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums von 467 nm nach 598 nm. Zwischen der Proteinmenge in Lösung und der Zunahme der Absorption bei 598 nm besteht über einen weiten dynamischen Bereich ein linearer Zusammenhang. Dieser

erstreckt sich von $10 \mu\text{g mg}^{-1}$ bis 16 mg mL^{-1} mit einer minimalen Empfindlichkeit von 200 ng Protein [57,58]. In Einwegküvetten werden $20 \mu\text{L}$ Proteinprobe vorgelegt ($0,4 - 20 \mu\text{g}$ Gesamtproteinmasse) und mit $1,25 \text{ mL}$ Arbeitslösung (Lösung D, siehe Tabelle 4.24) vermischt. Nach 30 min Inkubation bei Zimmertemperatur (ZT) erfolgt die Messung der Absorption bei 470 nm und 600 nm . Die Standardgerade ergibt sich durch Auftragung der Proteinmasse gegen den Quotienten der Absorptionen bei 600 nm und 470 nm ($A_{600 \text{ nm}}/A_{470 \text{ nm}}$). Abbildung 4.4 zeigt eine beispielhafte BSA-Standardreihe einer kolorimetrischen Proteinbestimmung mit Pyrogallolrot. In Tabelle 4.24 sind die Zusammensetzungen der für die Proteinbestimmung benötigten Lösungen aufgelistet.

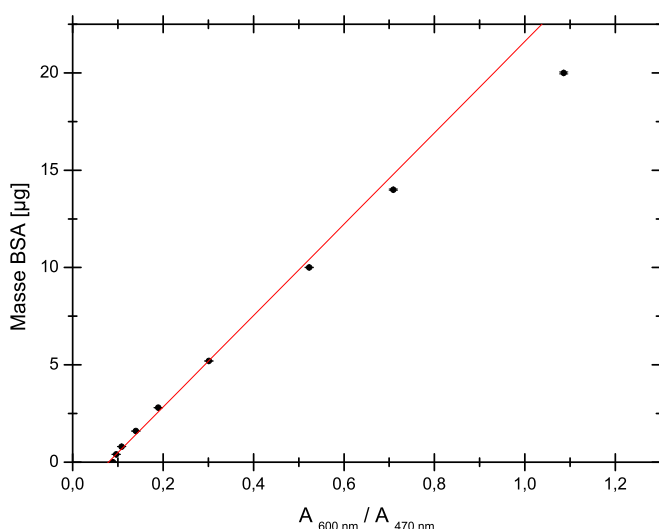


Abbildung 4.4: Typische BSA-Standardreihe einer kolorimetrischen Proteinbestimmung mit Pyrogallolrot. Aufgetragen ist die Proteinmasse an BSA [μg] gegen den Quotienten der Absorptionen bei 600 nm und 470 nm . Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen der Absorptionswerte der vierfach bestimmten BSA-Verdünnungen (vier Replikate). Das Bestimmtheitsmaß R^2 liegt hier bei $0,9894$.

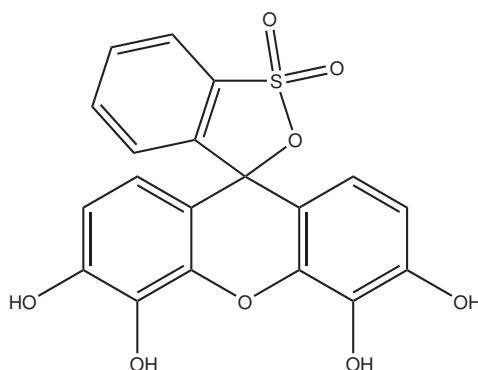


Abbildung 4.5: Strukturformel von Pyrogallolrot (<http://www.sigmaaldrich.com>).

Tabelle 4.24: Zusammensetzung der Lösungen für die Proteinbestimmung nach der Pyrogallolrot-methode^[57].

Lösung A		Lösung B	
$1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Pyrogallolrot in Methanol	$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$
Lösung C		Lösung D	
$2,42 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{-Succinat} \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	4 % (v/v)	Lösung A
$1,16 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_2\text{-Oxalat}$	0,4 % (v/v)	Lösung B
$3,86 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Na-Benzozat	90 % (v/v)	Lösung C
		pH 2,5	mit HCl einstellen

4.7 Gelelektrophoretische Trennverfahren

Zur Trennung, Reinigung und Analyse von Proteinen hat sich in den letzten Jahrzehnten der Einsatz der chemisch inerten und stabilen Matrix Polyacrylamid für gelelektrophoretische Anwendungen durchgesetzt. Polyacrylamid entsteht durch Kopolymerisation der Monomereinheiten Acrylamid und N,N' -Methylenbisacrylamid. Die Polymerisationsreaktion wird durch Ammoniumperoxodisulfat (APS) gestartet und durch die Anwesenheit von N,N,N',N' -Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert. Als Parameter zur Einstellung der Porengröße eines Gels, verwendet man die Totalacrylamidkonzentration T (% (w/v)) und den Quervernetzungsgrad C (% (w/w)). Diese Parameter sind wie folgt definiert.

$$T = \frac{\text{Acrylamid[g]} + \text{Quervernetzer[g]}}{\text{Volumen Lösung[mL]}} \quad [\% \text{ (w/v)}] \quad (4.3)$$

$$C = \frac{\text{Quervernetzer[g]}}{\text{Acrylamid[g]} + \text{Quervernetzer[g]}} \quad [\% \text{ (w/w)}] \quad (4.4)$$

Um kleinere Poren in einem Gel zu erhalten, muss der Wert für T steigen und die Konzentration an Quervernetzer konstant gehalten werden. Der Porendurchmesser vergrößert sich für hohe und niedrige Werte an C bei konstantem T . Vernetzungsgrade höher 5 % ergeben spröde und hydrophobe Gele, die schlechter handzuhaben sind^[59].

4.7.1 Denaturierende Gelelektrophorese

Die bekannteste Art der denaturierenden Gelelektrophorese ist die SDS-PAGE nach Laemmli (1970)^[60]. SDS denaturiert Proteine, indem es durch Anlagerung an hydrophobe Bereiche von Proteinen einen SDS-Protein-Komplex mit konstantem Ladungs-zu-Masse-Verhältnis ausbildet (1,4 g SDS pro g Protein in einer einprozentigen SDS-Lösung) und zusätzlich die Eigenladung der Proteine überdeckt. Das Reduktionsmittel DTT reduziert im Protein vorhandene

Disulfidbrücken, sodass die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstruktur des Proteins aufgelöst ist. Zur Verminderung von Proteinaggregation wird die SDS-PAGE als diskontinuierliche PAGE betrieben, d. h. die Gelmatrix ist in ein weitporiges Sammelgel und ein engmaschiges Trenngel aufgeteilt. Zwischen dem Tris-Glycin-Puffer (Elektrophoresepuffer) an der Kathode und dem Tris-Chlorid-Puffer im Sammelgel bildet sich bei Anlegen einer Spannung ein elektrischer Feldstärkegradient aus. Hierin wandern Chlorid-Ionen mit hoher Mobilität, aber geringer Feldstärke, als Leitonen, die bei pH 6,8 wenig negativ geladenen Glycinat-Ionen mit niedriger Mobilität und hoher Feldstärke als Folgeionen. Zwischen Leit- und Folgeionen wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe nach dem Prinzip der Isotachophorese und erfahren hierbei eine Konzentrierung (stacking-Effekt). An der Grenze zum engmaschigen Trenngel sind die Proteine erhöhten Reibungskräften ausgesetzt, wodurch sich ihre Mobilität weiter verringert. Der erhöhte pH-Wert im Trenngel (pH 8,8) vergrößert die Mobilität des Folgeions, welches nun wieder geladen vorliegt und den Proteinstapel überholt. Die Auftrennung der Proteine erfolgt nun auf Grund des Molekularsiebeffektes der Gelmatrix im homogenen Puffermedium nach deren Molekularmasse (Zonenelektrophorese) ^[59,61].

Tabelle 4.25: Zusammensetzung der Gelpuffer (Sammel- und Trenngel), des SDS-Auftragspuffers und des Elektrophoresepuffers für Glycin-SDS-Gele.

SDS-Sammelgelpuffer (8x)		SDS-Trenngelpuffer (4x)	
1 mol L ⁻¹	Tris	1,5 mol L ⁻¹	Tris
pH 6,8	mit HCl einstellen	pH 8,8	mit HCl einstellen
SDS-Auftragspuffer		Elektrophoresepuffer	
15 % (w/v)	Saccharose	0,4 mol L ⁻¹	Glycin
2,5 % (w/v)	SDS	5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Tris
0,25 % (w/v)	Na ₂ CO ₃	0,1 % (w/v)	SDS
0,04 % (w/v)	Bromphenolblau	pH 8,5	stellt sich ein
2,5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	DTT		

Zur Denaturierung der mittels SDS-PAGE zu analysierenden Probe mischt man einen Teil Probe mit einem Teil SDS-Auftragspuffer. Das übliche Erhitzen dieser Mischung auf 95 °C führt bei der Denaturierung von Membranproteinen zu unerwünschten Aggregationen, weshalb auf diesen Arbeitsschritt verzichtet wird. Tabelle 4.26 zeigt das Pipettierschema für vier kleine SDS-Gele. Limitierender Faktor der Elektrophoreseparameter ist hier die Spannung. Es wird zum Einlaufen der Proteine in das Trenngel eine Spannung von 100 V eingestellt, danach erfolgt eine Erhöhung der Spannung auf 130 V.

4.7.2 Native Gelelektrophorese

Die native Gelelektrophorese ist eine etablierte Methode zur Auftrennung von Protein(super)komplexen in ihrer natürlichen Form. Im Unterschied zu denaturierenden Elektrophoresearten wie der SDS-PAGE, enthalten die Kathodenpuffer entweder keine separaten Ladungsträger (CN-PAGE) ^[62], oder es werden milde, nicht denaturierende Detergensgemische

Tabelle 4.26: Pipettierschema für vier kleine SDS-Gele (Dicke 0,75 mm) mit $T = 13\%$ im Trenngel und $T = 5\%$ im Sammelgel.

Bestandteil	Trenngel	Bestandteil	Sammelgel
T [% (w/v)]	13	T [% (w/v)]	5
C [% (w/v)]	4	C [% (w/v)]	3,3
Gel A [mL]	8,32	Gel A/B 29:1 [mL]	1,25
Gel B [mL]	5,2	Sammelgelpuffer (8x) [mL]	1,25
Trenngelpuffer (4x) [mL]	5	bidest. H_2O [mL]	7,34
bidest. H_2O [mL]	1,2	Entgasen	
Entgasen		SDS (20 % (w/v)) [μ L]	50
SDS (20 % (w/v)) [μ L]	100	TEMED [μ L]	10
TEMED [μ L]	15	APS [μ L]	100
APS [μ L]	150	Gesamtvolumen [mL]	10
Gesamtvolumen [mL]	20		

wie DOC/DDM zugegeben (hrCN-PAGE)^[63], oder der Ladungsträger ist ein nicht denaturierender Farbstoff (BN-PAGE)^[64]. Bei der CN-PAGE beruht somit die elektrophoretische Mobilität der Proteinkomplexe allein auf ihrer intrinsischen Ladung, wohingegen bei der hrCN-PAGE und der BN-PAGE durch Zugabe von Ladungsträgern die Proteinkomplexe mit einer netto-negativen Ladung maskiert werden, ohne die hydrophoben Protein-Protein-Wechselwirkungen zu zerstören. Wie bei der SDS-PAGE, bedient man sich auch bei der nativen PAGE eines diskontinuierlichen Gelsystems. Hier findet allerdings, im Unterschied zur SDS-PAGE, keine Konzentrierung (stacking Effekt) der Proteine im Sammelgel statt. Das weitmaschige Sammelgel bei der nativen PAGE erleichtert den Eintritt großer Protein(super)komplexe in das Gel und vermindert die Aggregation dieser. Um die Bandenschärfe sowie den Trennbereich für die native PAGE zu erhöhen, verwendet man Gradienten von Polyacrylamid. Die Gesamtacrylamidkonzentration T steigt dabei linear von z. B. 3 % zu Beginn des Gels auf bis zu 16 % am Gelende. Für unterschiedliche Organismen eignen sich unterschiedliche Gradientenbereiche, sodass je nach Anwendung eine Anpassung vorzunehmen ist. Ein wichtiger Faktor für die erfolgreiche Durchführung einer nativen PAGE ist die Wahl des Gelpuffersystems. Für pflanzliche Proben (Chloroplasten) und prokaryontische Organismen hat sich die Bandenschärfe in Bezug auf Proteinkomplexe mit Bis-Tris-Gelpuffern als gut erwiesen. Untersucht man jedoch Mitochondrien aus Eukaryonten, so eignet sich hierfür das Imidazolgelpuffersystem besser^[65]. Neben dem Gradientenbereich kann auch die Gelgröße variiert werden. In dieser Arbeit werden kleine, mittlere und große Gele verwendet, deren genaue Abmessungen in Tabelle 4.27 zusammengefasst sind. Für kleine und mittlere Gele eignen sich Spacer der Dicke 1,5 mm, für große Gele 1,5 – 5,8 mm.

Das Gießen von Gradientengelen erfolgt durch Mischen von Acrylamidgellösungen unterschiedlicher Konzentrationen (niederprozentig und hochprozentig, z.B. 3,5 und 12 %) in einem Gradientenmischer. Eine Peristaltikpumpe befördert die Gellösungsmischung über eine Kanüle, oder direkt über eine seitliche Öffnung, in die Gelgießapparatur und generiert somit einen linearen Gradienten (siehe schematische Abbildung 4.6).

Tabelle 4.27: Abmessungen für unterschiedliche Gelgrößen. Das Innenmaß beschreibt hierbei die Größe des Gels alleine, das Außenmaß die Größe des Gels inklusive der Spacer.

Gelgröße	Innenmaß, Breite × Höhe [cm ²]	Außenmaß, Breite × Höhe [cm ²]
klein	7,8 × 7,4	10,0 × 8,2
mittel	7,8 × 9,2	10,0 × 10,5
groß	17,6 × 16,0	18,0 × 16,0

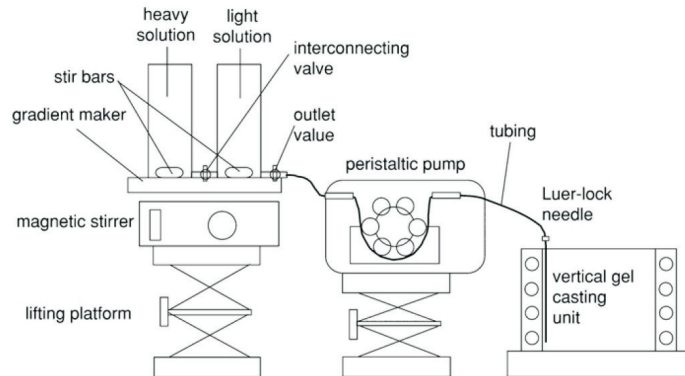


Abbildung 4.6: Schematische Darstellung zur Herstellung eines Gradientenpolyacrylamidgels^[65].

Für die unterschiedlichen Gelformate stehen verschiedene Gelgießapparaturen zur Verfügung, die von Krause und Seelert (2008)^[65] beschrieben werden. Die Herstellung von vier kleinen Gradientengelen (Dicke 1,5 mm) mit der „Multiple Gel Caster“-Apparatur von Hoefer erfolgt mit einer kleinen Modifikation nach^[19]. Die 50 % (w/v) Saccharoselösung, die benötigt wird um das komplette Gellösungsvolumen zwischen die Glasplatten zu befördern, versetzt man zur besseren Kenntlichmachung mit 500 µL Ponceau S-Lösung. Bei nativen Elektrophoresen erfolgt die Limitierung der elektrischen Parameter über die Stromstärke, wobei hier 15 mA pro 1,5 mm Geldicke einzustellen sind.

4.7.2.1 Blau-native Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Das Prinzip der BN-PAGE beruht auf der Maskierung von nativen Proteinkomplexen mit einer nettonegativen Ladung durch den blauen Farbstoff Coomassie G-250 (siehe Abbildung 4.7).

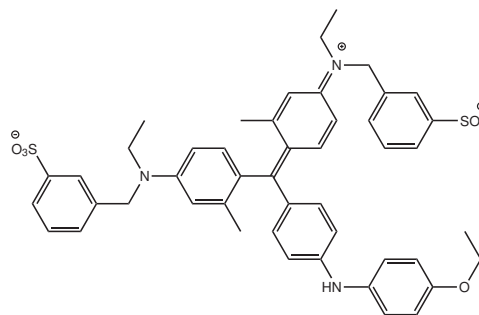


Abbildung 4.7: Strukturformel des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie G-250^[66].

Dieser Triphenylmethanfarbstoff lagert sich an hydrophobe Bereiche von Proteinen an, ohne diese zu denaturieren. Durch Anlegen einer Spannung können somit Protein(super)komplexmischungen in ihrer natürlichen Struktur elektrophoretisch separiert werden. Während der Migration der Komplexe durch das Polyacrylamidgel führt der Siebeffekt des Gels dazu, dass eine Auftrennung nach molekularer Masse der Proteine erfolgt. Nach Schägger *et al.* (1994)^[62] besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der molaren Masse und der relativen Migrationsstrecke für Proteine mit einem isoelektrischen Punkt kleiner 8,6.

4.7.2.1.1 Bis-Tris-BN-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinkomplexen aus pflanzlichen Proben, im Speziellen aus Chloroplasten, hat sich für die native Gelelektrophorese das Bis-Tris-Gelpuffer-System durchgesetzt. Im Unterschied zum Imidazol-Gel-Puffer-System zeigt dieses eine bessere Auflösung der einzelnen Proteinkomplexbanden im Gel^[65]. In Tabelle 4.28 sind die Zusammensetzungen der einzelnen für die Bis-Tris-BN-PAGE benötigten Puffer aufgelistet.

Tabelle 4.28: Zusammensetzung der Gelpuffer (oben und unten), des Anodenpuffers und der Kathodenpuffer (B, B/10) für Bis-Tris-BN-Gele.

Gelpuffer oben (3x)		Gelpuffer unten (3x)	
0,15 mol L ⁻¹	Bis-Tris	0,15 mol L ⁻¹	Bis-Tris
0,6 mol L ⁻¹	6-Aminocapronsäure	0,6 mol L ⁻¹	6-Aminocapronsäure
pH 7,0	mit HCl einstellen	60 % (w/v)	Glycerin
Kathodenpuffer B		Kathodenpuffer B/10	
5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Tricin	5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Tricin
1,5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Bis-Tris	1,5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Bis-Tris
0,02 % (w/v)	Coomassie G-250	0,002 % (w/v)	Coomassie G-250
pH 7,0	stellt sich ein	pH 7,0	stellt sich ein
Anodenpuffer			
5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Bis-Tris		
pH 7,0	mit HCl einstellen		

Für pflanzliche Proben ist es üblich, den B/10 Kathodenpuffer für die BN-PAGE zu verwenden, da eine zu hohe Konzentration an Coomassie G-250 z. B. zu einer teilweisen Dissoziation der ATP-Synthase aus Chloroplasten in die Subkomplexe CF₀ und CF₁ führen kann^[67]. Die Elektrophorese wird bei 100 V und 15 mA pro 1,5 mm Geldicke gestartet und nach Einlaufen der blauen Laufront in das Trenngel auf 250 V für kleine und mittlere Gele und 500 V für große Gele erhöht. Tabelle 4.29 zeigt das Pipettierschema für vier kleine BN-Gradientengele von 3,5 bis 12 % für die „Multiple Gel Caster“-Apparatur von Hoefer.

4.7.2.1.2 Imidazol-BN-PAGE

Für die Durchführung einer nativen PAGE mit Proteinen aus tierischen Organismen (z. B. Rinderherzmitochondrien) eignet sich das Imidazolgelpuffersystem besser als das Bis-Tris-

Tabelle 4.29: Pipettierschema für vier kleine BN-Gele von 3,5 bis 12 %. Der Pipettieransatz gilt für die „Multiple Gel Caster“-Apparatur von Hoefer.

Bestandteil	Trenngel		Sammelgel
	oben	unten	
T [% (w/v)]	3,5	12	3
C [% (w/w)]	3	3	3
Gel A/B 29:1 [mL]	1,26	4,33	1,02
Gel A [μ L]	183	630	100
Gelpuffer (3x) [mL]	5,33	5,33	5
bidest. H ₂ O[mL]	9,1	5,6	8,7
TEMED [μ L]	8	5,53	12,22
APS [μ L]	80	55,3	122,2
Gesamtvolumen [mL]	16	16	15

Gelpuffersystem. Die Zusammensetzung der für die Imidazol-BN-PAGE benötigten Puffer ist in Tabelle 4.30 dargestellt.

Tabelle 4.30: Zusammensetzung der Gelpuffer (oben und unten), des Anodenpuffers und der Kathodenpuffer (B, B/10) für Imidazol-BN-Gele.

Gelpuffer oben (3x)		Gelpuffer unten (3x)	
$7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Imidazol	$7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Imidazol
$1,5 \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocaprinsäure	$1,5 \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocaprinsäure
pH 7,0	mit HCl einstellen	60 % (w/v)	Glycerin
Kathodenpuffer B		pH 7,0	mit HCl einstellen
$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin	Kathodenpuffer B/10	
$7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Imidazol	$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
0,02 % (w/v)	Coomassie G-250	$7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Imidazol
pH 7,0	stellt sich ein	0,002 % (w/v)	Coomassie G-250
Anodenpuffer		pH 7,0	stellt sich ein
$2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Imidazol		
pH 7,0	mit HCl einstellen		

4.7.2.2 Farblos-native Gelelektrophorese (CN-PAGE)

Bei der CN-PAGE handelt es sich um eine mildere Variante der BN-PAGE. Der Kathodenpuffer enthält kein Coomassie G-250, sodass die Nettoladung des System alleine auf der intrinsischen Ladung der Proteinkomplexe beruht. Dies führt dazu, dass nur saure Proteine mit einem isoelektrischen Punkt kleiner sieben eine Migration zur Anode erfahren. Im Vergleich zur BN-PAGE hat die CN-PAGE eine geringere Auflösung der Proteinbanden. Die CN-PAGE hat allerdings auch Vorteile gegenüber der BN-PAGE. Zum einen erfahren die Proteinkomplexe nahezu keine Denaturierung während der Elektrophorese und zum anderen bietet die CN-PAGE Vorteile, wenn

das Gel nach der Elektrophorese weiteren analytischen Techniken unterzogen wird, z. B. *In-Gel*-Aktivitätstests, bei denen der Coomassie-Farbstoff stören kann^[68]. Für die CN-PAGE werden prinzipiell die selben Pufferlösungen wie für die BN-PAGE verwendet (siehe Tabelle 4.28), nur enthält der Kathodenpuffer kein Coomassie G-250. Die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen der BN-PAGE (Einlaufen bei 100 V und 15 mA pro 1,5 mm Geldicke, nach Einlaufen in Trenngel Erhöhung auf 250 V für kleine und mittlere Gele und 500 V für große Gele).

4.7.2.3 Hochauflösende farblos-native Gelelektrophorese (hrCN-PAGE)

Den Nachteil der schlechten Auflösung von Proteinbanden in CN-Gelen kann man mit Hilfe der hrCN-PAGE beseitigen. Durch Zugabe eines milden, ionischen Detergens zum Kathodenpuffer, wie z. B. DOC oder TDOC, erfahren die Proteinkomplexe wie bei der BN-PAGE eine Maskierung der Eigenladung. Die nun nettonegativ geladene Probe kann durch Anlegen einer Spannung zur Anode wandern. Zusätzlich führt die Zugabe eines milden, nichtionischen Detergens, wie z. B. DDM oder Digitonin, zu einer verminderten Aggregation der hydrophoben Membranproteine beim Eintreten in das Sammelgel und bei der Wanderung durch Sammel- und Trenngel. Die Konzentration des ionischen Detergens im farblosen Kathodenpuffer liegt bei 0,05 % (w/v), die des Nichtionischen bei 0,02 % (w/v). Die Einstellungen der Spannung und der Stromstärke entsprechen denen aus Abschnitt 4.7.2.2.

4.7.2.4 Präparative Gelelektrophorese

Während bei den oben beschriebenen analytischen, gelelektrophoretischen Methoden die aufgetrennten Proteine indirekt weiterbearbeitet werden (*In-Gel*-Aktivitätstests, Quantifizierung, Färben), nutzt man die präparative, native Gelelektrophorese, um große Mengen an Proteinkomplexen (bis zu 2 mg mL^{-1} Protein) aufzutrennen und im Anschluss per Elution diese aufgereinigten Proteine zu isolieren. Es handelt sich bei der präparativen Gelelektrophorese also um eine Aufreinigungsmethode für Proteine, welche im Anschluss daran für verschiedene Methoden direkt zur Verfügung stehen (z. B. Kristallisation, Strukturaufklärung oder Aktivitätsmessungen). Für präparative Gele verwendet man Spacer mit Dicken von 3 – 5,8 mm und üblicherweise große Gelapparaturen ($18 \times 16 \text{ cm}^2$ Außenmaß). Es werden alle Varianten der nativen PAGE, sowie verschiedene Gradientenzusammensetzungen für präparative, elektrophoretische Anwendungen benutzt. Aufgrund der Dicke präparativer Gele und der damit verbundenen hohen Stromstärken (40 mA pro 4 mm Geldicke) während der Elektrophorese, ist eine intensive Kühlung der Gele dringend erforderlich. Die genaue Durchführung der Herstellung und Elektrophorese von präparativen Gelen ist bei Heidrich (2007)^[69] bereits beschrieben.

4.7.2.5 Erhöhte Hydrophilie und Porendurchmesser in nativen Gelen

Um native Proteinkomplexe aus Polyacrylamidgelen leicht eluieren zu können, ist ein großer Porendurchmesser der Gelmatrix entscheidend. In klassischen Polyacrylamidgelen, bestehend

aus Acrylamid, welches mit *N,N'*-Methylenbisacrylamid quervernetzt ist, erreicht man maximale Porendurchmesser von etwa 100 nm (*T* und *C* klein, oder *C* groß bei konstantem *T*). PA-Gele mit diesen Parametern sind aber sehr schlecht zu handhaben, da sie entweder eher schleimig sind, oder zu hydrophob und spröde werden. Zur Erhöhung des Porendurchmessers und der Gelhydrophilie eignet sich die Verwendung von *N,N'*-(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid (DHEBA) als Quervernetzer. Hiermit werden Porendurchmesser von etwa 400 nm bei Konzentrationen an *C* bis zu 50 % erreicht^[70]. Es werden verschiedene Konzentrationen an DHEBA verwendet, wobei sich ein steigender Gradient an *T* (3,5– 12 %) und ein fallender Gradient an *C* (20–5 %) als vergleichbar in Bezug auf das Laufverhalten von Proteinen im klassischen Gelsystem erweisen (siehe Abschnitt 5.4.3 auf Seite 131). Die folgende Abbildung zeigt die Struktur eines mit DHEBA quervernetzten PA-Gels.

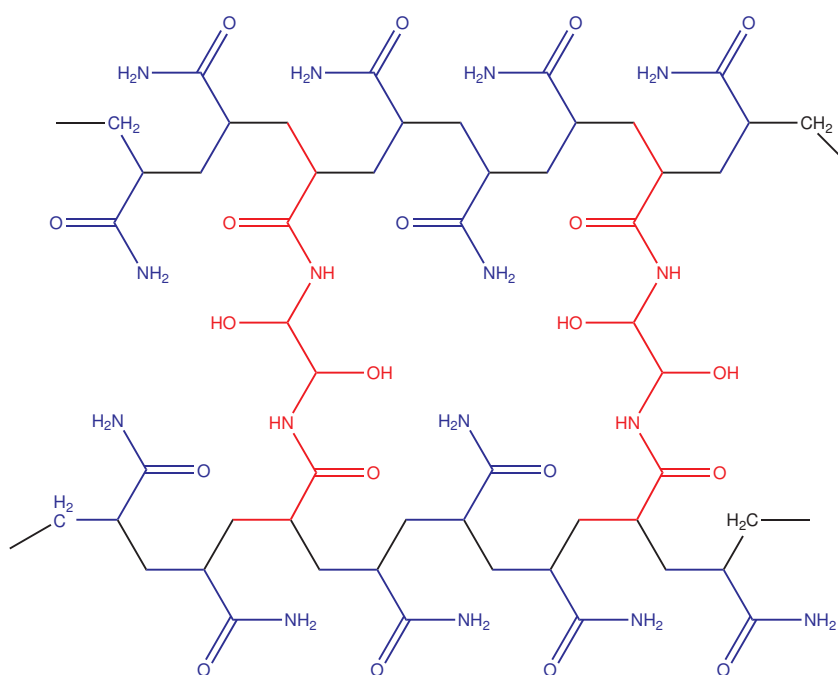


Abbildung 4.8: Struktur eines mit DHEBA quervernetzten PA-Gels. In blau sind Acrylamidmonomereinheiten angedeutet, in rot Monomereinheiten von *N,N'*-(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid. Die Kette wird an den vier ausgeschriebenen -CH₂- Einheiten fortgesetzt.

4.7.2.6 Proteinkonzentrierung mittels Y-förmigen nativen Gelen

Wie im vorigen Abschnitt (4.7.2.5) beschrieben, führt die Vergrößerung des Porendurchmessers in PA-Gelen zu einer erleichterten Elution von Proteinkomplexen aus diesen Gelen. Allerdings führt die mitausgeschnittene Gelmenge, in der sich der zu eluierende Proteinkomplex befindet, zu Schwierigkeiten^[71]. Eine Möglichkeit, die Gelmenge für die Elution zu verringern, stellen Yeh *et al.* (2010)^[72] vor. Hierbei wird aus einem präparativen Gel die interessierende Proteinbande ausgeschnitten und in eine andere Gelapparatur eingebaut. Diese Gelapparatur besitzt modifizierte Spacer, die ein Y-förmiges Gel generieren. Die zu Beginn breite Proteinbande wird während der Elektrophorese nach unten hin schmaler, bis sich das zu eluierende Protein am Ende in einer minimalen Gelmenge befindet, also konzentriert wird. Das Sammelgel, das den

größten Teil des Gels ausmacht, hat eine Konzentration von $T = 3\%$, das kurze Trenngel ist mit $T = 8\%$ höher konzentriert. In Abbildung 4.9 ist der Aufbau sowie die Funktionsweise eines Y-förmigen Gels schematisch dargestellt.

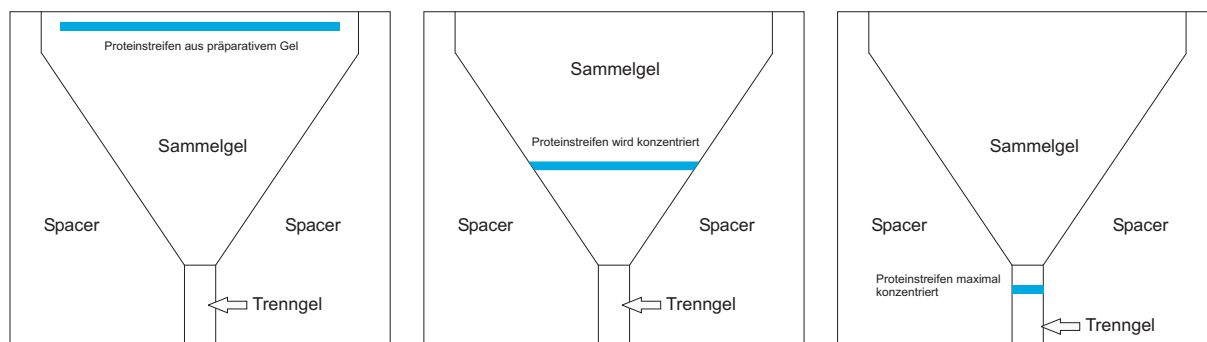


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweise eines Y-förmigen Gels. Eine Proteinbande aus einem präparativen Gel wird oben in die Gelapparatur eingebaut (linkes Bild). Aufgrund der modifizierten Spacer wird der zu Beginn breite Proteinstreifen während der Migration durch das Sammelgel konzentriert (mittleres Bild). Im Trenngel erfolgt die maximale Konzentrierung des Proteins, das sich nun in einer minimalen Gelmenge befindet und hieraus eluiert werden kann (rechtes Bild) [72].

4.7.3 Mehrdimensionale Gelelektrophorese

Mit Hilfe der beschriebenen nativen Gelelektrophoresen erfolgt eine Auftrennung von Proteinkomplexen in der ersten Dimension (1D). Diese Proteinkomplexe können unter denaturierenden Bedingungen in der zweiten Dimension (nativer 1D-Gel-Streifen um 90° drehen) in ihre jeweiligen Untereinheiten separiert werden (2D-SDS-PAGE). Diese als Spots im 2D-Gel aufgetrennten Proteinuntereinheiten stehen für weitere Analysen wie z. B. Massenspektrometrie oder Quantifizierungen zur Verfügung. Statt einer denaturierenden zweiten Dimension kann auch eine native durchgeführt werden (2D-BN-PAGE). Die Zugabe eines milden Detergens, wie beispielsweise DDM, zum Kathodenpuffer führt dazu, dass Proteinsuperkomplexe teilweise in die jeweiligen Proteinkomplexe zerfallen und sich somit in ihrem Laufverhalten von intakten Proteinsuperkomplexen unterscheiden (geringere Masse). Proteine, die durch das zusätzliche Detergens keine Veränderung erfahren, laufen in dieser zweiten nativen Dimension auf einer Diagonalen, alle anderen wandern unterhalb dieser. Wie für native Gele in der ersten Dimension, funktioniert der Nachweis von Proteinsuperkomplexen sowie Proteinkomplexen mit Hilfe von *In-Gel*-Aktivitätstests auch in der zweiten nativen Dimension [73]. Durch Erweiterung um eine dritte Dimension unter denaturierenden Bedingungen (3D-SDS-PAGE), können Protein(supr)komplexe aus der 2D-BN-PAGE in ihre jeweiligen Untereinheiten separiert und diese anschließend beispielsweise massenspektrometrisch charakterisiert werden.

4.7.3.1 2D-SDS-PAGE

Zur Denaturierung des nativen Gelstreifens (erste Dimension) erfolgt eine einstündige Inkubation in 1% (w/v) SDS/ 1% (v/v) β -Mercaptoethanol. Der Gelstreifen wird nun um 90°

gedreht und zwischen die Glasplatten einer Gelapparatur ($18 \times 16 \text{ cm}^2$ oder $10 \times 10,5 \text{ cm}^2$) eingespannt. Das Prinzip der 2D-SDS-PAGE ist in folgender Abbildung schematisch dargestellt.

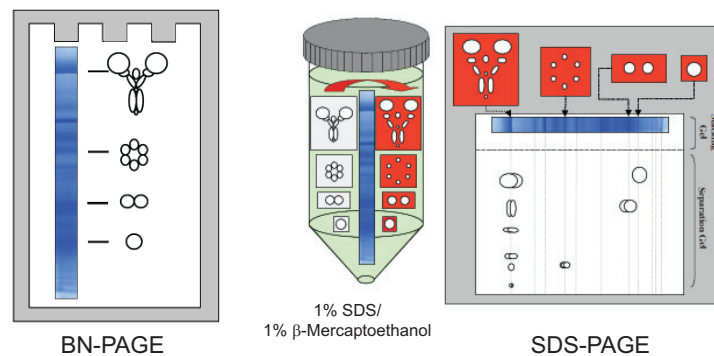


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung des Prinzips der 2D-SDS-PAGE. Nach der Auftrennung der Protein(supern)komplexe in der ersten nativen Dimension wird ein Streifen ausgeschnitten und in 1 % (w/v) SDS/ 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol 1 h inkubiert. In der zweiten denaturierenden Dimension erfolgt die Auftrennung in die einzelnen Proteinuntereinheiten (modifiziert nach [74]).

Die Totalacrylamidkonzentration des Trenngels beträgt $T = 13 \%$. Die verwendeten Lösungen zum Gießen von 2D-SDS-Gelen sind in Tabelle 4.31 aufgelistet. Das Gießen des Tricin-SDS-Trenngels, sowie der beiden Sammelgele ist bereits in anderen Arbeiten ausführlich beschrieben [75,76].

Tabelle 4.31: Zusammensetzung des Trenngelpuffers, des Sammelgelpuffers, des „nativen“ Sammelgelpuffers, des Kathodenpuffers und des Anodenpuffers für 2D-SDS-Gele.

Trenngelpuffer		Sammelgelpuffer	
3 mol L ⁻¹	Tris	3 mol L ⁻¹	Tris
0,15 % (w/v)	SDS	0,15 % (w/v)	SDS
30 % (w/v)	Glycerin	pH 8,5	mit HCl einstellen
pH 8,5	mit HCl einstellen	Kathodenpuffer	
Sammelgelpuffer „nativ“		0,1 mol L ⁻¹	Tricin
0,15 mol L ⁻¹	Bis-Tris	0,1 mol L ⁻¹	Tris
0,6 mol L ⁻¹	6-Aminocapronsäure	0,05 % (w/v)	SDS
0,2 % (w/v)	SDS	pH 7,25	stellt sich ein
pH 7,0	mit HCl einstellen	Anodenpuffer	
		0,1 mol L ⁻¹	Tris
		pH 8,9	mit HCl einstellen

4.7.3.2 2D-SDS-PAGE nach Ahn

Eine Variante der 2D-SDS-PAGE, die ohne Sammelgel(e) auskommt, wird nach Ahn *et al.* (2001) [77] durchgeführt. Der für die 2D-SDS-PAGE verwendete 1D-Streifen wird direkt in ein kontinuierliches Gel gegossen. In Tabelle 4.32 ist die Zusammensetzung des Gelpuffers sowie das Pipettierschema für ein 2D-SDS-Ahn-Gel aufgeführt.

Tabelle 4.32: Zusammensetzung des Gelpuffers nach Ahn *et al.* (2001) sowie benötigte Lösungen zum Gießen eines 2D-SDS-Ahn-Gels.

Trenngelpuffer (2x) nach Ahn <i>et al.</i>		Bestandteil	Trenngel
0,152 mol L ⁻¹	Tris	T [% (w/v)]	12
0,2 mol L ⁻¹	L-Serin	C [% (w/v)]	4
0,2 mol L ⁻¹	Glycin	Gel A/B 29:1 [mL]	5,96
0,2 mol L ⁻¹	L-Asparagin	Gel B [mL]	0,84
pH 7,4	einstellen	Trenngelpuffer (2x) [mL]	10
		bidest. H ₂ O [mL]	3,02
		SDS (20 % (w/v)) [μL]	100
		TEMED [μL]	6,91
		APS [μL]	69,1
		Gesamtvolumen [mL]	20

4.7.3.3 2D-BN-PAGE

Für die 2D-BN-PAGE ist eine teilweise Dissoziation der in der ersten nativen Dimension getrennten Proteinsuperkomplexe in die entsprechenden Protein- oder Subkomplexe nötig. Ohne diese Dissoziation verliefen alle Proteine in der zweiten nativen Dimension entlang einer Diagonalen. Zur Einleitung des partiellen Zerfalls in die jeweiligen Subkomplexe fügt man dem Kathodenpuffer (B oder B/10) 0,02 % DDM zu. Wie bei der 2D-SDS-PAGE wird der native 1D-Streifen um 90° gedreht und in eine entsprechende Gelapparatur eingebaut (groß oder mittel). Im Unterschied zum 2D-SDS-Gel handelt es sich bei der zweiten nativen Dimension um ein Gradientengel, welches entsprechend der ersten Dimension gegossen wird. Bis auf den modifizierten Kathodenpuffer unterscheiden sich die verwendeten Lösungen nicht von den in Tabelle 4.28 aufgeführten.

4.7.3.4 3D-SDS-PAGE

Zur weiteren Analyse von Proteinspots aus einem 2D-BN-Gel werden diese ausgestochen und etwa 30 min in 50 μL SDS-Auftragspuffer inkubiert (Zusammensetzung siehe Tabelle 4.25). Anschließend überführt man die Gelstücke in die Taschen eines Glycin-SDS-Gels (Dicke 1,5 mm, siehe Abschnitt 4.7.1 auf Seite 44) und pipettiert zusätzlich 20 μL der jeweiligen Inkubationslösung dazu. In dieser dritten Dimension erfolgt die Auftrennung der Protein(super)komplexe in die jeweiligen Untereinheiten. Zu Charakterisierungszwecken können diese im Anschluss beispielsweise massenspektrometrisch untersucht werden.

4.7.4 Gelelektrophoretische Molmassenkalibrierung

Um Aussagen bezüglich der Molmasse eines Proteins in einem Polyacrylamidgel treffen zu können, bedarf es einer entsprechenden Kalibrierung. Aufgrund der Tatsache, dass in einem Polyacrylamidgel über einen bestimmten Bereich ein linearer Zusammenhang zwischen dem

Logarithmus der Molmasse und der Wanderungstrecke von Proteinen besteht, kann durch den Einsatz von Proteinstandards (bekannte Molmassen) die Molmasse von unbekannten Proteinen im Gel ermittelt werden. Für SDS-Gele wird ein Low Molecular Weight-Marker (LMW-Marker) verwendet, für native Gele bedient man sich eines High Molecular Weight-Markers (HMW-Marker). Bei den in diesen Standards verwendeten Proteinen handelt es sich um wasserlösliche Proteine. Für Membranproteine eignen sich diese Marker nur bedingt, da das Laufverhalten dieser beiden Proteinarten in der PA-Gelmatrix unterschiedlich ist. Zur genaueren Massenzuordnung hydrophober Protein(super)komplexe sollte deshalb zusätzlich zu den kommerziell erhältlichen Standards Solubilisat aus Rinderherzmitochondrien (BHM) mit bekannten apparenten Molmassen der darin enthaltenen Protein(super)komplexe^[78] aufgetragen werden. Aus Tabelle 4.33 können die jeweiligen Zusammensetzungen der Standards entnommen werden.

Tabelle 4.33: Zusammensetzung des Low Molecular Weight-Markers, sowie des High Molecular Weight-Markers. Der LMW-Standard wird in SDS-Gelen benutzt, der HMW-Standard in nativen Gelen.

LMW-Standard			
Protein	Quelle	Molmasse [kDa]	Konzentration [mg mL ⁻¹]
Phosphorylase b	Kaninchemuskel	97	0,335
Albumin	Rinderserum	67	0,415
Ovalbumin	Hühnereiweiß	45	0,735
Carbonanhydrase	Rinder-Erythrozyten	30	0,415
Trypsininhibitor	Sojabohne	20,1	0,4
α -Lactalbumin	Kuhmilch	14,4	0,58
HMW-Standard			
Thyroglobulin	Schweineschilddrüse	669	0,76
Ferritin	Pferdemilz	440	0,5
Catalase	Rinderleber	232	0,36
Lactat Dehydrogenase	Rinderherz	140	0,48
Albumin	Rinderserum	67	0,4

4.7.5 Methoden zur Färbung von Gelen

4.7.5.1 Coomassie-Färbung

Es wird eine leichte Modifikation der Coomassie-Färbung nach Rexroth *et al.* (2003)^[79] verwendet. Hierbei wird dem Farbstoff Coomassie R-250 das dimethylierte Derivat Coomassie G-250 zugesetzt. Die Nachweisgrenze für Coomassie R-250 liegt bei 50 – 100 ng Protein pro Bande im Gel^[80]. Coomassie G-250 ist weniger sensitiv als Coomassie R-250, die Mischung reduziert jedoch die Hintergrundfärbung. Nach der Elektrophorese erfolgt die Färbung des Gels unter leichtem Schwenken in der Färbelösung für 20 – 40 min. Zur Fixierung der Proteine im Gel enthalten die Lösungen Essigsäure. Mit Coomassie können sowohl native als auch SDS-Gele gefärbt werden. Bei SDS-Gelen muss vor der Färbung jedoch überschüssiges SDS von den Gelen

gewaschen werden (15 min unter Schütteln in Entfärbelösung inkubieren). Tabelle 4.34 listet die Zusammensetzungen aller für die Coomassie-Färbung/Entfärbung benötigten Lösungen auf. Alle im Folgenden durchgeführten Gelfärbungen mit Coomassie beziehen sich immer auf die Verwendung der hier aufgeführten Färbelösungsmischung der Farbstoffe Coomassie G-250 und Coomassie R-250.

Tabelle 4.34: Zusammensetzung der Coomassie-Färbe- und -Entfärbelösung.

Lösung A		Lösung B	
$4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	$1,17 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Coomassie G-250
20 % (v/v)	Essigsäure	$3,63 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Coomassie R-250
Färbelösung		90 % (w/v)	Methanol
0,5 mL mL ⁻¹	Lösung A	Entfärbelösung	
0,5 mL mL ⁻¹	Lösung B	$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$
		10 % (v/v)	Essigsäure
		25 % (v/v)	Methanol

4.7.5.2 Silber-Färbung

Eine wesentlich sensitivere Färbemethode im Vergleich zur Coomassie-Färbung stellt die Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987)^[81] dar. Die Nachweisgrenze liegt hier im Subnanogramm-bereich, allerdings ist der dynamische Bereich schlechter als bei der Färbung mit Coomassie. Das Prinzip der Silberfärbung beruht auf der Bindung von Silber-Ionen an Proteine im Gel, wodurch eine Reduktion zu elementaren Silberkeimen die Folge ist. Mit starken Reduktionsmitteln werden alle übrigen Silber-Ionen zu elementarem Silber reduziert, was in der Nähe von Silberkeimen deutlich schneller von statten geht als im übrigen Gel. Die Proteinbanden oder -spots färben sich bei diesem Prozess braun bis schwarz. Die Reaktion der Färbung wird durch Erniedrigung des pH-Wertes, z. B. mit Essigsäure, gestoppt. Das hier verwendete Färbeprotokoll enthält leichte Modifizierungen^[82]. Tabelle 4.35 gibt die für das Färbeprotokoll entsprechend benötigten Lösungen und Reagenzien an.

4.7.5.3 Gegenionenfärbung

Bei der Gegenionenfärbung handelt es sich um eine Färbemethode, die mit sehr wenig unspezifischer Hintergrundfärbung einhergeht. Anionische und kationische Farbstoffmoleküle (Ethylviolett, Zincon) bilden in der Färbelösung Ionenpaarkomplexe aus. Es besteht ein Gleichgewicht zwischen freien Farbstoffmolekülen in der Lösung und Ionenpaarkomplexen. Zur Färbung der Proteine in der Gelmatrix stehen nur die wenigen freien Farbstoffmoleküle zur Verfügung, so dass unspezifische Färbungen stark reduziert werden. Die Nachweisgrenze ist vergleichbar mit der von Coomassie^[83]. In folgender Abbildung sind die Strukturen der beiden Farbstoffmoleküle gezeigt (4.11). Nach der Elektrophorese erfolgt für mindestens 30 min eine Inkubation in 70 mL Wasch/Fixierlösung unter leichtem Schütteln. Die Färbung der Proteine im Gel mit der

Tabelle 4.35: Färbeprotokoll zur Silberfärbung nach Blum *et al.* (1987) mit leichten Modifikationen nach Rabilloud *et al.* (1988).

Schritt	Komponente	Konzentration
Fixierschritt I (2 × 30 min)	Methanol	50 % (v/v)
	Essigsäure	12 % (v/v)
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 500 mL
Fixierschritt II (3 × 20 min)	Ethanol	50 % (v/v)
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 600 mL
Sensitivierer (1 × 1 min)	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	8,06 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 200 mL
Waschschrift (2 × 1 min) mit bidest. H ₂ O		
Silber (1 × 20 min)	AgNO ₃	1,18 · 10 ⁻² mol L ⁻¹
	Formaldehyd (37 %ig)	0,075 % (v/v)
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 200 mL
Waschschrift (1 × 1 min) mit bidest. H ₂ O		
Färbung	Na ₂ CO ₃	0,57 mol L ⁻¹
	Na ₂ S ₂ O ₃ · 5 H ₂ O	2,02 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹
	Formaldehyd (37 %ig)	0,05 % (v/v)
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 250 mL
Waschschrift mit bidest. H ₂ O		
Stopplösung (1 × 10 min)	Essigsäure	10 % (v/v)
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 200 mL
Lagerlösung	Essigsäure	1 % (v/v)
	in bidest. H ₂ O	V _{Gesamt} = 200 mL

Färbelösung muss mindestens 45 min bis maximal 2 h andauern. Ein kurzer Spülschritt (≤ 30 s) mit Wasch/Fixierlösung beseitigt überschüssigen Farbstoff. Abschließend werden die Gele 5 min in bidest. H₂O geschüttelt.

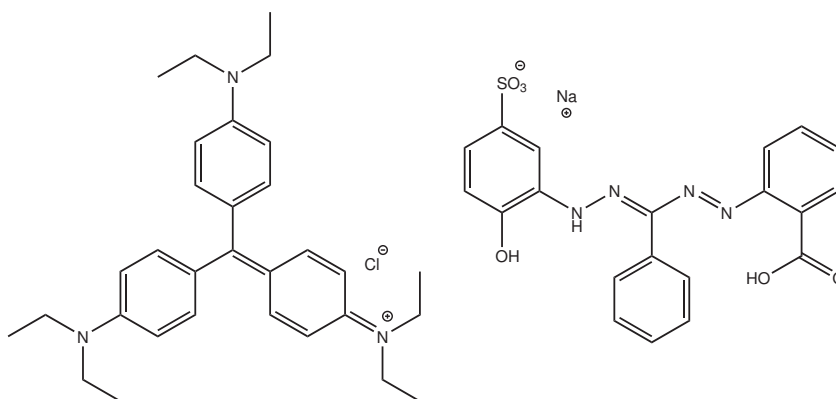


Abbildung 4.11: Strukturen der Farbstoffmoleküle für die Gegenionenfärbung. Links Ethylviolett, rechts Zincon (Strukturformeln von <http://www.sigmaaldrich.com>).

In Tabelle 4.36 sind die Zusammensetzungen aller Lösungen für die Gegenionenfärbung aufgelistet.

Tabelle 4.36: Zusammensetzung der Farbstoffstammlösungen, der Wasch/Fixierlösung sowie der Färbelösung für die Gegenionenfärbung nach Choi *et al.* (2002) ^[83].

Stammlösung Zincon		Stammlösung Ethylviolett	
0,4 % (w/v)	Zincon in Methanol	0,3 % (w/v)	Ethylviolett in Ethanol (vergällt)
Wasch/Fixierlösung		Färbelösung	
40 % (v/v)	Ethanol (vergällt)	24 % (v/v)	Ethanol (vergällt)
10 % (v/v)	Essigsäure	7 % (v/v)	Essigsäure
		0,004 % (w/v)	Zincon
		0,003 % (w/v)	Ethylviolett

4.8 In-Gel-Aktivitätstests

Eine elegante Methode zum Nachweis von Proteinkomplexen ist die histochemische Färbung in nativen Gelen. Für Atmungskettenkomplexe z. B. existieren verschiedene Tests, bei denen Redoxreaktionen in Verbindung mit dem jeweiligen aktiven Enzym zu farbigen Niederschlägen führen. Aufgrund der Färbung der Proteinbande im Gel kann auf das entsprechende aktive Enzym zurückgeschlossen werden. Mit dieser Methode können ebenfalls Proteinsuperkomplexe, die aus unterschiedlichen Proteinkomplexen bestehen (z. B. I₁III₂IV₁), sowohl in der ersten nativen Dimension, als auch in mehrdimensionalen nativen Elektrophoresen nachgewiesen werden. Mittlerweile existieren für alle fünf Atmungskettenkomplexe (Komplexe I-V) aus Mitochondrien entsprechende Aktivitätstest-Protokolle ^[84].

4.8.1 Aktivitätstest für Komplex I

Der Test beruht auf der Reduktion des gelben Tetrazoliumsalzes NBT zu violetter Formazan durch das aktive Enzym NADH-Dehydrogenase ^[85]. Ist eine Proteinbande mit diesem aktiven Enzym im Gel vorhanden, so färbt sich diese violett. Das zu untersuchende Gel wird 20 – 40 min unter leichtem Schütteln im Testpuffer inkubiert, bis die Färbung der entsprechenden Proteinbanden ausreichend sichtbar ist. Ein kurzer Inkubationsschritt (15 min) in Stopp/Fixierlösung beendet die Reaktion und die Proteine werden im Gel fixiert. Vor der Dokumentation erfolgt ein 10 minütiger Waschschriff in bidest. H₂O. Die Zusammensetzung der Testlösung ist in folgender Tabelle angegeben. Abbildung 4.12 fasst die ablaufenden Reaktionen während der Inkubation in der Testlösung bei Vorhandensein von aktivem Komplex I zusammen.

Tabelle 4.37: Zusammensetzung des Testpuffers für NADH-Dehydrogenase-Aktivität (Komplex I) ^[85].

Aktivitätstestlösung für Komplex I		Stopp/Fixierlösung	
0,1 mol L ⁻¹	Tris	50 % (v/v)	Methanol
0,768 mol L ⁻¹	Glycin	10 % (v/v)	Essigsäure
4,89 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	NBT		
pH 7,4	mit HCl einstellen		
1 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	β-NADH		

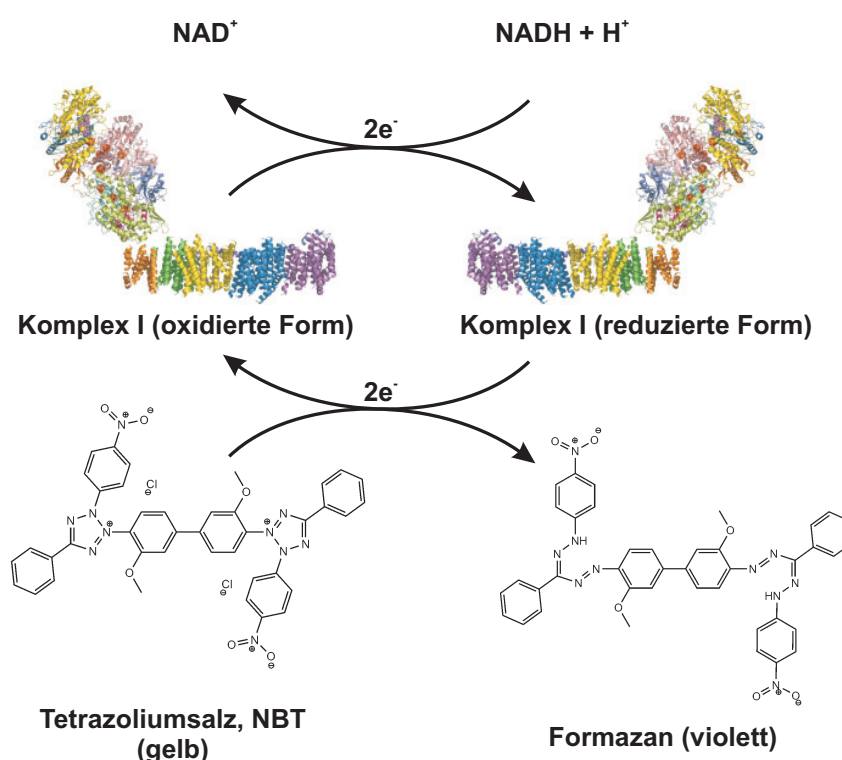


Abbildung 4.12: Ablaufende Reaktionen während des Aktivitätstests für Komplex I. Die NADH-Dehydrogenase oxidiert das Substrat NADH + H⁺ zu NAD⁺. Die reduzierte Form von Komplex I nimmt zwei Elektronen des Tetrazoliumsals auf, welches dadurch zu violetterem Formazan reduziert wird. Die Struktur für Komplex I ist nach Efremov *et al.* (2010) ^[86] modifiziert.

4.8.2 Aktivitätstest für Komplex II

Der Test funktioniert prinzipiell genauso wie der Test auf aktiven Komplex I, nur muss hier statt NADH Succinat als Substrat verwendet werden, welches durch Komplex II zu Fumarat oxidiert wird. Die reduzierte Form der Succinat-Dehydrogenase kann somit zwei Elektronen des Tetrazoliumsals aufnehmen und dieses dadurch zum violetten Formazan reduzieren. Die übrigen Substanzen des Puffers sind im Vergleich zum Komplex I Aktivitätstest-Puffer modifiziert ^[84]. Die Durchführung des Tests erfolgt analog zu der für Komplex I beschriebenen (4.8.1).

4.8.3 Aktivitätstest für Komplex III

Durch Umsetzung von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zum entsprechend oxidierten Polymer (braunes Präzipitat), lässt sich in nativen Gelen aktive Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III) histochemisch nachweisen^[63]. DAB überträgt Elektronen auf Cytochrom c in Komplex III wodurch das oxidierte DAB als braunes Präzipitat in der Komplex III enthaltenden Proteinbande im Gel ausfällt und die Bande färbt. Die für den Aktivitätstest benötigten Lösungen setzen sich wie folgt zusammen (Tabelle 4.38). Die Durchführung des Tests erfolgt in analoger Weise zum Test auf Komplex I.

Tabelle 4.38: Zusammensetzung des Testpuffers für Cytochrom-c-Reduktase (Komplex III)^[63], sowie der Stopp/Fixierlösung.

Aktivitätstestlösung Komplex III		Stopp/Fixierlösung	
$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	50 % (v/v)	Methanol
pH 7,2	einstellen	10 % (v/v)	Essigsäure
$1,58 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	DAB		

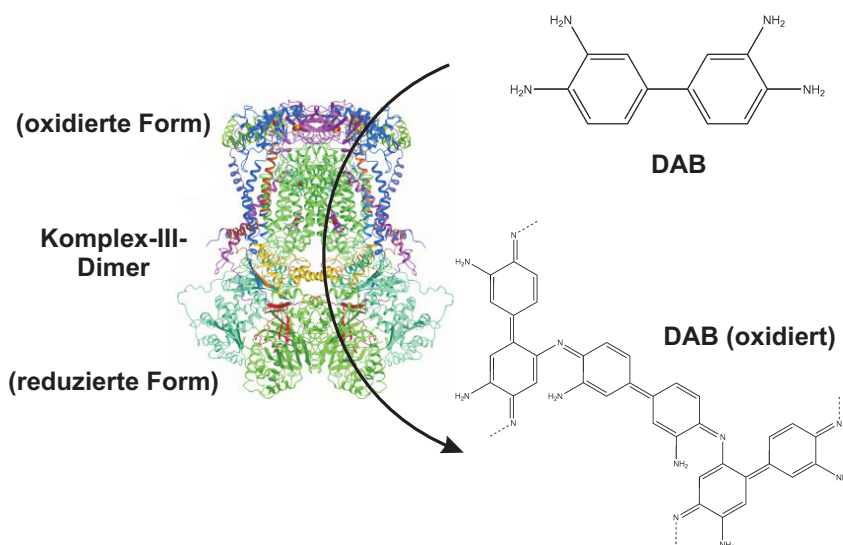


Abbildung 4.13: Nachweis von aktiver Cytochrom-c-Reduktase (Komplex-III-Dimer) durch Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zum entsprechenden Polymer in nativen Gelen. Die Struktur von Komplex III ist modifiziert nach Iwata *et al.* (1998)^[87], Reaktionsschema nach Seligman *et al.* (1968)^[88].

4.8.4 Aktivitätstest für Komplex IV

Auch hier wird die Aktivität des Proteinkomplexes durch Oxidation von DAB sichtbar. DAB überträgt Elektronen auf in der Aktivitätstestlösung vorhandenes Cytochrom c. Komplex IV oxidiert Cytochrom c und nutzt die Elektronen zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasser. Es wird die nach Wittig *et al.* (2007) modifizierte Testlösung verwendet, deren einzelne Bestandteile in Tabelle 4.39 wiedergegeben sind. Die Dauer der Färbung sollte eine Stunde nicht überschreiten.

Tabelle 4.39: Zusammensetzung des Testpuffers für Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV)^[84], sowie der Stopp/Fixierlösung.

Aktivitätstestlösung Komplex IV		Stopp/Fixierlösung	
$5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$	50 % (v/v)	Methanol
pH 7,2	einstellen	10 % (v/v)	Essigsäure
$5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Cytochrom c		
$1,58 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	DAB		

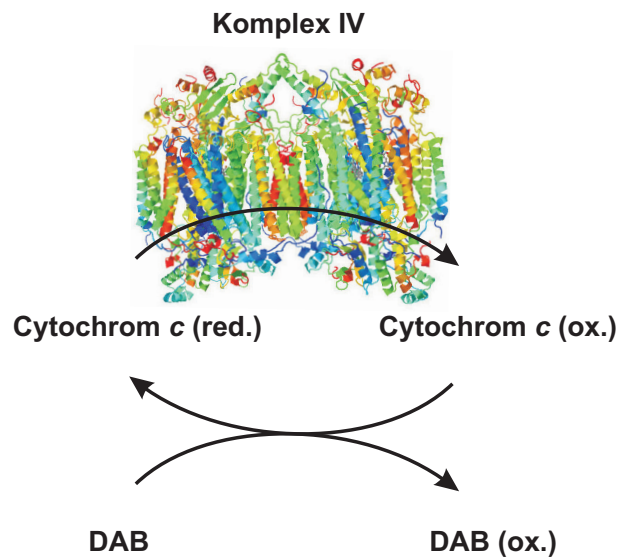


Abbildung 4.14: Nachweis von aktiver Cytochrom-c-Oxidase (Komplex IV) durch Oxidation von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) zum entsprechenden Polymer in nativen Gelen. Struktur von Komplex IV modifiziert nach Tsukihara *et al.* (1996)^[89].

4.8.5 Aktivitätstest für Komplex V

Mit Hilfe dieses Tests kann die Hydrolyseaktivität der ATP-Synthase in einem nativen Gel nachgewiesen werden. Das bei der Hydrolyse freigesetzte Orthophosphat P_i (PO_4^{3-}) reagiert mit Bleinitrat zu schwer löslichem Bleiphosphat, das als weiße Bande präzipitiert. Oftmals ist dieses Präzipitat jedoch schwierig zu dokumentieren, sodass eine weitere Reaktion mit Ammoniumsulfid durchgeführt wird. Hierbei wandelt man Bleiphosphat in noch schwerer lösliches Bleisulfid um, welches als braune bis schwarze Bande gut zu detektieren ist^[90]. Die Inkubation des nativen Gels mit aktivem Komplex V erfolgt für mindestens eine Stunde. Die Reaktion wird anschließend mit 50 % (v/v) Methanol gestoppt. Die Stopplösung darf nicht sauer sein (vergleiche Stopp/Fixierlösung in Tabelle 4.37), da dies ein Auflösen des weißen Bleiphosphats zur Folge hätte. Nach mehrmaligem Waschen des Gels mit bidest. H_2O findet durch Zugabe von Ammoniumsulfidlösung (1 % (v/v)) die abschließende Fällung zu Bleisulfid statt. Tabelle 4.40 listet die Zusammensetzung der jeweils benötigten Lösungen auf und Abbildung 4.15 stellt die ablaufenden Reaktionen schematisch dar.

Tabelle 4.40: Zusammensetzung des Testpuffers für die ATP-Hydrolyse-Aktivität von Komplex V^[85], der Stopplösung, sowie der Lösung zur Bleisulfid-Fällung^[90].

Aktivitätstestlösung Komplex V		Stopplösung	
$3,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tris	50 % (v/v)	Methanol
$0,27 \text{ mol L}^{-1}$	Glycin	Ammoniumsulfidlösung	
$1,4 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	500 μL	1 % (v/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}$
0,2 % (w/v)	Blei(II)nitrat		
pH 7,8	mit HCl einstellen		
$8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Na-ATP		

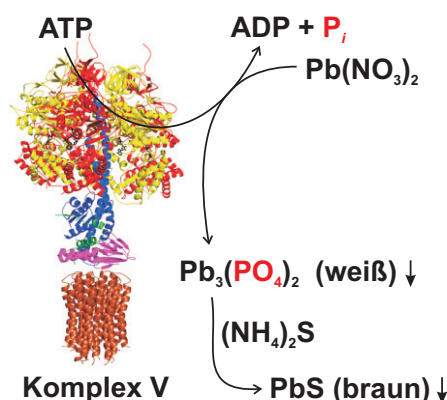


Abbildung 4.15: Ablaufende Reaktionen während des Aktivitätstests für Komplex V. Es wird die Hydrolyse von ATP durch Komplex V nachgewiesen. Freigesetztes Orthophosphat (P_i) reagiert mit Bleinitrat zu Bleiphosphat, welches in einer weiteren Reaktion mit Ammoniumsulfid zu schwer löslichem, schwarzbraunen Bleisulfid umgesetzt wird. Die Struktur der ATP-Synthase ist nach Watt *et al.* (2010)^[91] modifiziert.

Nach etwa einer halben Stunde wird die Sulfidfällung durch mehrmaliges Waschen mit bidest. H_2O gestoppt und das Gel dokumentiert.

4.8.6 Inhibierung von Enzymaktivitäten in nativen Gelen

Um die Spezifität von *In-Gel*-Aktivitätstests nachzuweisen, verwendet man Inhibitoren für die jeweiligen Enzyme. Nach der nativen Elektrophorese wird das Gel zunächst in einer Pufferlösung ohne enzymespezifisches Substrat, aber mit dem jeweiligen Inhibitor inkubiert (30 min). Hieran schließt sich die Inkubation in Pufferlösung mit Substrat und Inhibitor an. Durch direkten Vergleich von Gelen die mit bzw. ohne Inhibitor behandelt werden, können Rückschlüsse über die Spezifität des betrachteten Enzymnachweises gezogen werden. Im Folgenden sind die verwendeten Pufferlösungen der *In-Gel*-Inhibierung für Komplex I und Komplex IV aufgelistet (Tabellen 4.41 und 4.42). Die Konzentrationen der Puffersubstanzen und Substrate beruhen auf dem Protokoll von Grandier-Vazeille und Guérin (1996)^[85] bzw. Wittig *et al.* (2007)^[63], die Durchführung der *In-Gel*-Inhibierung erfolgt nach Jung *et al.* (2000)^[92].

Tabelle 4.41: Zusammensetzung des *In-Gel*-Inhibierungspuffers für Komplex I^[85,92].

Präinkubations-Puffer für Komplex I mit Inhibitor, ohne Substrat	
0,1 mol L ⁻¹	Tris
0,768 mol L ⁻¹	Glycin
pH 7,4	mit HCl einstellen
2 · 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	Rotenon (Inhibitor)
Inhibierungspuffer für Komplex I	
0,1 mol L ⁻¹	Tris
0,768 mol L ⁻¹	Glycin
0,4 mg mL ⁻¹	NBT
pH 7,4	mit HCl einstellen
1 · 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	β-NADH
2 · 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	Rotenon (Inhibitor)

Tabelle 4.42: Zusammensetzung des *In-Gel*-Inhibierungspuffers für Komplex IV^[63,92].

Präinkubations-Puffer für Komplex IV mit Inhibitor, ohne Substrat	
5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O
pH 7,2	mit HCl einstellen
2 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	KCN (Inhibitor)
Inhibierungspuffer für Komplex IV	
5 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Na ₃ PO ₄ · 12 H ₂ O
pH 7,2	mit HCl einstellen
1,57 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	DAB
5 · 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹	Cytochrom c
2 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	KCN (Inhibitor)

4.9 *In-Lösung*-Aktivitätstests

Enzymaktivitäten können auch spektralphotometrisch in Lösung gemessen werden. Hierbei wird die Abnahme der Absorption des Substrates bei Zugabe des entsprechenden Enzyms beobachtet. Die Differenzierung zwischen dem Aktivitätsmesssignal des Enzyms und unspezifischen Absorptionsänderungen erfolgt durch Zugabe eines für das betrachtete Enzym charakteristischen Inhibitors. Nach Subtraktion der Steigung nach Inhibitorzugabe von der Steigung der GesamtabSORPTIONSÄNDERUNG erhält man die spezifische Enzymaktivität. Für die Aktivitätsmessung von Komplex I (NADH-Dehydrogenase) wird die Absorptionsänderung des Substrates NADH bei 340 nm gemessen. Zur Optimierung der Messmethode werden verschiedene Protokolle kombiniert^[93,94]. In einer Quarzglasküvette wird 1 mL Substratlösung vorgelegt und die NADH-Absorption bei 340 nm etwa eine Minute lang gemessen. Nach Zugabe von ca. 50 µg Rinderherzmitochondrien nimmt man den Signalabfall so lange auf, bis die Steigung annähernd konstant ist und gibt abschließend den für Komplex I spezifischen Inhibitor Rotenon hinzu. Die

Messung ist nach Erreichen einer nahezu konstanten Steigung beendet. In folgender Tabelle sind die Zusammensetzungen und Konzentrationen der benötigten Stammlösungen und Puffer für die spektralphotometrische Aktivitätstestmessung von Komplex I aufgelistet. Um sowohl die Zugänglichkeit des Substrates als auch des Inhibitors zu Komplex I zu erleichtern, werden die Rinderherzmitochondrien im Vorhinein mit einem hypotonischen Puffer behandelt. 200 μL BHM (25,88 mg mL^{-1}) vermischt mit 200 μL einer 1:10 Verdünnung aus der Pufferstammlösung (siehe Tabelle 4.43) werden stark geschüttelt und 10 min bei $20000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wird in 200 μL Puffer (1:10 verdünnt) resuspendiert und die Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wiederholt. 5 μL dieser Mischung (12,94 mg mL^{-1}) werden mit 95 μL verdünntem Puffer auf 0,647 mg mL^{-1} verdünnt (1:20). Für die Aktivitätsmessung pipettiert man 80 μL (ca. 50 μg) BHM zu 1 mL der in der Küvette vorgelegten Substratlösung, deren Zusammensetzung in Tabelle 4.44 aufgeführt ist. Bei konstanter Steigung des Messsignals bei 340 nm inhibiert man Komplex I durch Zugabe von 20 μL Rotenon. Die Referenz hat die gleiche Zusammensetzung wie die Substratlösung, es wird aber kein NADH und kein Digitonin zugegeben.

Tabelle 4.43: Zusammensetzungen und Konzentrationen der Stammlösungen für die spektralphotometrische Aktivitätsmessung von Komplex I aus Rinderherzmitochondrien^[93,94].

Puffer-Stammlösung		
0,15 mol L^{-1}	NaCl	
$7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Imidazol	
pH 7,4	mit HCl einstellen	
Stammlösungen Substrate		
$1,3 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	β -NADH	Lösung 1
$7,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Decylubichinon (in DMSO)	Lösung 2
Stammlösungen Inhibitoren		
0,5 mg mL^{-1}	Antimycin A (in 50 % (v/v) Ethanol)	Lösung 3
1 mol L^{-1}	KCN	Lösung 4
2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Rotenon (in DMSO)	Lösung 5
Detergens-Stammlösung		
10 % (w/v)	Digitonin	

4.10 Western-Blotting

Für immunologische Nachweise von Proteinen eignet sich die Methode des Western-Blottings. Hierbei transferiert man Proteine aus SDS-Gelen oder Protein(supernatant)komplexe aus nativen Gelen elektrophoretisch auf eine PVDF- oder NC-Membran. Die somit immobilisierten Proteine stehen nun einer Vielzahl an immunologischen Analysen zur Verfügung. Das zu blottende Gel wird nach der Elektrophorese zunächst für 15 min in SDS-Elektrophoresepuffer inkubiert (siehe Tabelle 4.25). Jeweils ein Blottingpapier (Rotilabo[®]-Blottingpapiere, Dicke 1,5 mm) für Kathode und Anode, sowie die PVDF-Membran (Sequi-Blot[™]), werden dem Gelformat entsprechend

Tabelle 4.44: Zusammensetzungen der Substratlösung für die spektralphotometrische Aktivitätsmessung von Komplex I aus Rinderherzmitochondrien^[93,94].

Substratlösung vorgelegt in 1 mL Küvette		
0,1 % (w/v)	Digitonin	
0,1 mL mL ⁻¹	Puffer	
$2 \cdot 10^{-4}$ mol L ⁻¹	β -NADH	(aus Lösung 1)
$1,5 \cdot 10^{-4}$ mol L ⁻¹	Decylubichinon	(aus Lösung 2)
2 μ g mL ⁻¹	Antimycin A	(aus Lösung 3)
$2 \cdot 10^{-3}$ mol L ⁻¹	KCN	(aus Lösung 4)
mit MilliQ-Wasser auf 1 mL auffüllen		

zurechtgeschnitten. Die Inkubation der Blottingpapiere erfolgt kurz für die Kathodenseite in Blot 2K Arbeitslösung bzw. in Blot 2A Arbeitslösung für die Anodenseite. Zur Herabsetzung der Hydrophobizität der PVDF-Membran wird diese unmittelbar vor dem Blotten 1 – 2 s in Methanol p. A. (100 %) geschwenkt. Der Aufbau der einzelnen Bestandteile in der Semi-Dry-Blotting-Apparatur ist in Abbildung 4.16 schematisch dargestellt.

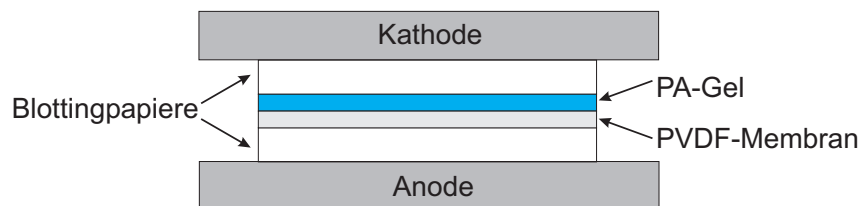


Abbildung 4.16: Aufbau der zum Blotten benötigten Komponenten. Das in Blot 2A Arbeitslösung inkubierte Blottingpapier (weiß) wird mittig auf der Anode (dunkelgrau) positioniert. Darüber folgt die Platzierung der PVDF-Membran (hellgrau), gefolgt von dem PA-Gel (blau). Abschließend setzt man auf der Kathodenseite (dunkelgrau) das in Blot 2K geschwenkte Blottingpapier (weiß).

Um einen optimalen Transfer zu gewährleisten, muss der Blotaufbau luftblasenfrei sein. Die Stromstärke wird bei einer Spannung von 25 V auf 1 mA cm⁻² begrenzt und der Blot bei nativen Gelen nach 35 min, bei SDS-Gelen nach 45 min beendet. In Tabelle 4.45 sind die Zusammensetzungen der beiden Arbeitslösungen Blot 2K und Blot 2A aufgelistet.

Tabelle 4.45: Arbeitslösungen Blot 2K für die Kathodenseite und Blot 2A für die Anodenseite einer Semi-Dry-Western-Blot-Apparatur.

Arbeitslösung Roti®-Blot 2K		Arbeitslösung Roti®-Blot 2A	
10 % (v/v)	Roti®-Blot 2K (10x)	10 % (v/v)	Roti®-Blot 2A (10x)
20 % (v/v)	Methanol p. A.	5 % (v/v)	Methanol p. A.
in bidest. H ₂ O		in bidest. H ₂ O	

Im Anschluss an das Western-Blotting werden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der PVDF-Membran geblockt. Hierzu wird entweder 5 % (w/v) Milchpulver in 1x PBST-Puffer gelöst verwendet, oder eine 1:10 Verdünnung der Blockierungslösung Roti®-Block (10x Konzentrat). Die Inkubation der Blot-Membran erfolgt für 1 h bei ZT oder über Nacht (üN) bei 4 °C. Zum

immunologischen Nachweis der auf der Membran immobilisierten Proteine färbt man diese mit geeigneten Antikörpern. Ein Primärantikörper bindet an das Antigen des Proteins und ein Sekundärantikörper an den anti-Antigen-Antikörper (Primärantikörper). Die Sichtbarmachung der Proteine erfolgt durch verschiedene Reaktionen am Sekundärantikörper. Je nach Art des Sekundärantikörpers kann dieser enzymgekoppelt sein, sodass beispielsweise Chemilumineszenz- oder Farbreaktionen die markierten Proteine sichtbar machen. Ist der Zweitantikörper mit einem Fluorophor gekoppelt, so erfolgt die Sichtbarmachung des Proteins durch Detektion des Fluoreszenzsignals. Die Blotmembran wird mit den jeweiligen Antikörpern eine Stunde bei ZT, oder bei 4 °C üN gefärbt. Nach jeder Antikörperinkubation entfernt man nicht gebundene Antikörper durch mehrmaliges Waschen der PVDF-Membran mit 1x PBST-Puffer. In dieser Arbeit werden zur immunologischen Detektion Enzym-konjugierte Sekundärantikörper verwendet, die im Folgenden näher erläutert sind.

4.10.1 Chemilumineszenz-Detektion

Das Enzym Meerrettich-Peroxidase (Horseradish peroxidase, HRP) katalysiert in Anwesenheit von H_2O_2 die Umsetzung von Luminol zum entsprechenden Oxidationsprodukt unter Freisetzung von Licht (Chemilumineszenz, siehe Abbildung 4.17). Durch Verwendung eines mit diesem Enzym konjugierten Sekundärantikörper erfolgt die immunologische Detektion von Proteinen per Chemilumineszenz. Nach einstündiger Inkubation der Blotmembran mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper wäscht man nicht gebundene Antikörper fünfmal mit PBST-Puffer (1x) und einmal mit PBS-Puffer (1x) weg (jeweils 10 min). Pro 10 cm^2 Blotmembran benötigt man 1 mL Chemilumineszenz-Arbeitslösung (selbst angesetzt^[95], oder SuperSignal® West Dura von Pierce), die gleichmäßig auf der Membran verteilt und das Signal nach einminütiger Inkubationszeit mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS-3000 von FujiFilm detektiert wird. Die einzelnen Bestandteile der verwendeten Puffer und Lösungen gibt Tabelle 4.46 wieder.

Tabelle 4.46: Zusammensetzung der Puffer und Lösungen zur Detektion der Chemilumineszenz von HRP-konjugierten Antikörpern auf einer PVDF-Blotmembran.

PBST-Puffer (10x)		PBS-Puffer (10x)	
$2,7 \cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$	KCl	$2,7 \cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$	KCl
$2 \cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$	KH_2PO_4	$2 \cdot 10^{-2}\text{ mol L}^{-1}$	KH_2PO_4
$1,37\text{ mol L}^{-1}$	NaCl	$1,37\text{ mol L}^{-1}$	NaCl
$0,1\text{ mol L}^{-1}$	Na_2HPO_4	$0,1\text{ mol L}^{-1}$	Na_2HPO_4
1 % (w/v)	Tween® 20	PBS-Puffer (1x)	
PBST-Puffer (1x)		$0,1\text{ mL mL}^{-1}$	PBS-Puffer (10x)
SuperSignal® West Dura		Arbeitslösung selbst angesetzt^[95]	
$0,5\text{ mL mL}^{-1}$	Peroxid-Lösung	$0,1\text{ mol L}^{-1}$	Tris/HCl pH 8,8
$0,5\text{ mL mL}^{-1}$	Luminol-Lösung	$1,25 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$	Luminol
		$2 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$	4-IPBA (in DMSO)
		$5,3 \cdot 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$	H_2O_2

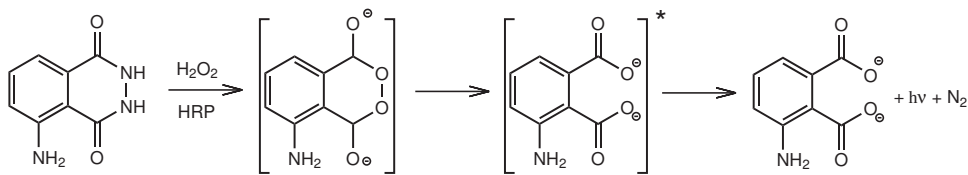


Abbildung 4.17: Chemilumineszenzreaktion von Luminol durch Horseradish peroxidase (HRP) in Anwesenheit von H_2O_2 . Luminol wird oxidativ zu 3-Aminophthalat im elektronisch angeregten Zustand umgesetzt. Die Rückkehr in den Grundzustand erfolgt unter Emission eines Photons, welches detektiert wird. Reaktionsschema nach Albrecht *et al.* (1990) [96].

4.10.2 Detektion alkalischer Phosphatase

Das Enzym alkalische Phosphatase (AP) katalysiert unter basischen Bedingungen die Hydrolyse von Phosphorsäureestern zum entsprechenden Alkohol und Phosphat. Bei Verwendung von 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP) als Phosphorsäureester in Kombination mit NBT erfolgt die Detektion des mit AP konjugierten Sekundärantikörpers durch eine Farbreaktion an der entsprechend markierten Proteinbande auf der Blotmembran. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 4.18 dargestellt. Im Anschluss an die einstündige Inkubation der PVDF-Membran mit AP-konjugiertem Sekundärantikörper wäscht man ungebundene Antikörper zweimal mit PBS-Puffer (1x) weg (jeweils 5 min). Vor der eigentlichen Färbung wird die Blotmembran zur pH-Einstellung (basisch) 5 min in Lösung A geschüttelt. Zur Färbung des Blots bedeckt man diesen gleichmäßig mit etwa 2 mm Lösung B ohne zu schütteln [97]. Die Dokumentation der PVDF-Membran erfolgt nach ausreichender Färbung und fünfminütigem Waschen mit bidest. H_2O .

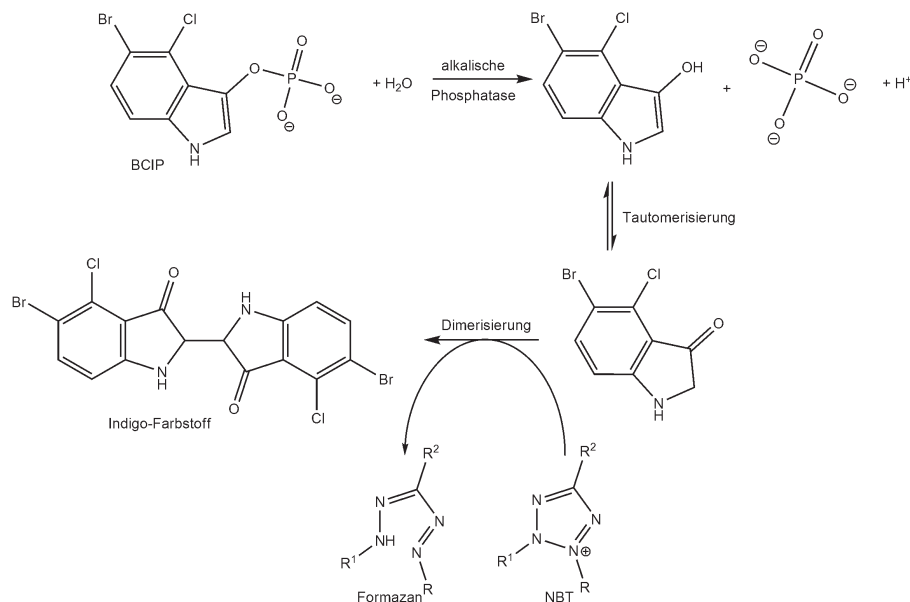


Abbildung 4.18: Reaktionsschema zur Detektion von alkalischer Phosphatase (AP). Der Phosphorsäureester BCIP wird unter basischen Bedingungen von AP zum entsprechenden Alkohol und Phosphat hydrolysiert. Nach Keto-Enol-Tautomerisierung erfolgt eine Dimerisierung unter gleichzeitiger Reduktion von NBT zum Formazan [98]. Violett Formazan präzipitiert am AP-konjugierten Sekundärantikörper und färbt somit das markierte Protein.

Die Zusammensetzung der Lösungen A und B ist Tabelle 4.47 zu entnehmen.

Tabelle 4.47: Zusammensetzung der Lösungen A und B zur Detektion von AP-konjugierten Antikörpern auf einer PVDF-Blotmembran.

Lösung A		Lösung B	
0,1 mol L ⁻¹	Tris	37,5 µL	BCIP (5 % (w/v) in DMF)
1 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	MgCl ₂ · 6 H ₂ O	50 µL	NBT (7,7 % (w/v) in 70 % (v/v) DMF)
0,1 mol L ⁻¹	NaCl	in 10 mL	Lösung A
pH 9,5	einstellen		

4.10.3 Verwendete Antikörper

In dieser Arbeit werden neben der immunochemischen Detektion verschiedener Proteinuntereinheiten der ATP-Synthase auch Antikörper zur Ermittlung von Untereinheiten aus Photosystemen (PSI und PSII), sowie mitochondrialen Proteinen wie Prohibitin und Hitze-Schock-Proteine (z. B. HSP-70) verwendet. Alle eingesetzten Antikörper (primär und sekundär) sind in den Tabellen 4.48 und 4.49 aufgeführt. Alle primären und sekundären Antikörper werden in PBS-Puffer der Firma Pierce verdünnt.

Tabelle 4.48: Verwendete Primärantikörper.

Antigen	Verdünnung	Organellen/Protein	Organismus
I	1:500	Chloroplasten F _O F ₁	<i>Spinacia oleracea</i>
β	1:10000	Chloroplasten F _O F ₁	<i>Spinacia oleracea</i>
α	1:5000	Chloroplasten F _O F ₁	<i>Spinacia oleracea</i>
III	1:2000	Chloroplasten F _O F ₁	<i>Spinacia oleracea</i>
ε	1:1000	Chloroplasten F _O F ₁	<i>Spinacia oleracea</i>
II	1:10000	Chloroplasten F _O F ₁	<i>Spinacia oleracea</i>
Prohibitin Ab-2	1:5000	Mitochondrien	Mensch, Schwein, Ratte, Maus, Huhn
PsaC	1:5000	Chloroplasten PSI	höhere Pflanzen, Grünalgen, Cyanobakterien
Cytochrom b ₆	1:10000	Chloroplasten	höhere Pflanzen, Grünalgen, Cyanobakterien
α	1:5000	MF _O F ₁	Mensch, Rind, Ratte, Maus
I (20 kDa)	1:5000	MF _O F ₁	Mensch, Rind, Maus
HSP70/HSC70	1:10000	globulär vorhanden	höhere Pflanzen, Ratte, Mensch
AOX1 (36 kDa)	1:10000	Mitochondrien	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
COXIIb (15 kDa)	1:5000	Mitochondrien	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>

Tabelle 4.49: Verwendete Enzym-konjugierte Sekundärantikörper.

Detektionssystem	Verdünnung	Antigen
HRP	1:2000	Kaninchen
HRP	1:2000	Maus
AP	1:2000	Kaninchen
AP	1:2000	Maus

4.10.4 Proteinstandard für Western-Blots

Als Proteinmassenstandard für Western-Blots von SDS-PA-Gelen wird MagicMark™ XP Western Protein Standard verwendet. Hierbei handelt es sich um in *E. coli* exprimierte Fusionsproteine mit verschiedenen Wiederholungseinheiten, wodurch die Massenvariation zustande kommt (220-20 kDa). Zusätzlich sind diese Proteine mit einer IgG-Bindestelle ausgestattet, sodass die Detektion per Antikörperfärbung erfolgen kann.

4.11 Elution von Protein(super)komplexen aus nativen PA-Gelen

Die Polyacrylamidgelelektrophorese stellt im Allgemeinen eine äußerst effiziente Methode zur Proteinauftrennung dar. Im Unterschied zu konventionellen Proteinreinigungen, die sehr viele Einzelschritte beinhalten und mit geringen Ausbeuten verbunden sind, wird die PAGE in einem Schritt durchgeführt. Zu Zwecken der Proteinisolierung und -charakterisierung ist es erforderlich, die im PA-Gel aufgetrennten Proteine oder Proteinkomplexe aus der Gelmatrix zu eluieren. Prinzipiell stehen verschiedene Möglichkeiten der Proteinelution aus PA-Gelen zur Verfügung^[71]. In dieser Arbeit wird die Diffusionselution und die Elektroelution aus nativen PA-Gelen angewandt.

4.11.1 Diffusionselution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen

Die Diffusionselution stellt zwar die einfachste Methode der Proteinelution dar, aber auch die aufwendigste. Zunächst muss nach der Gelelektrophorese das interessierende Protein im Gel gefunden werden. Nicht chromophorhaltige oder indirekt gefärbte Proteine (BN-PAGE) müssen zur Lokalisierung über Referenzspuren sichtbar gemacht werden (Färbung oder *In-Gel*-Aktivitätstest). Der zu eluierende Proteinkomplex wird aus einem präparativen nativen PA-Gel mit einem Skalpell herausgeschnitten und der Gelstreifen zerkleinert (ca. 0,125 mm³ kleine Gelstücke). Anschließend erfolgen abwechselnd Inkubations- (15 min in Elutionspuffer) und Zentrifugationsschritte (5000 × g), sowie eine abschließende Konzentrierung des eluierten Komplexes per Ultrafiltration. Die Zusammensetzung des Elutionspuffers (Stammlösung und Arbeitslösung) ist in Tabelle 4.50 aufgeführt. Die genaue Durchführung der Diffusionselution, sowie der anschließenden Konzentrierung ist bereits in einer anderen Arbeit beschrieben^[69].

Tabelle 4.50: Zusammensetzung des Elutionspuffers (Stammlösung und Arbeitslösung) für die Diffusionselution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen.

Stammlösung (100x)		Arbeitslösung (1x Stammlösung)	
0,5 mol L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O	5 · 10 ⁻³ mol L ⁻¹	MgSO ₄ · 7 H ₂ O
2 mol L ⁻¹	Tris	2 · 10 ⁻² mol L ⁻¹	Tris
pH 8,0	einstellen	0,02 % (w/v)	NaN ₃
2 % (w/v)	NaN ₃	0,2 % (w/v)	Digitonin
		pH 8,0	

4.11.2 Elektroelution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen

Die Elektroelution von Proteinkomplexen stellt eine weniger aufwendige Methode der Elution, im Vergleich zur Diffusionselution, dar. Allerdings erfolgt die Migration von Proteinkomplexen aus Gelstückchen besser, wenn an diese ein Ladungsträger gebunden ist (z. B. Coomassie G-250 in der BN-PAGE). In Abbildung 4.19 ist der Aufbau einer Elektroelutionszelle sowie die dazugehörige Elektroelutionskammer schematisch gezeigt. Vor der Durchführung der Elution werden die in 0,5 % (w/v) SDS gelagerten Dialysemembranen (Schutz vor Bewuchs durch Mikroorganismen) einige Stunden bidest. H₂O unter Rühren zur Entfernung des SDS gewaschen. Die Dialysemembran, auf der während der Elution die Proteine konzentriert werden, besitzt eine Porengröße von 2 kDa und wird am Fuß der Elutionszelle per Schraubgewinde befestigt. Zu Stabilisierungszwecken von zu eluierenden Proteinsuperkomplexen fügt man dem Elutionspuffer milde Detergenzien wie z. B. Digitonin zu (0,1 % (w/v)) zu. Die Elution kann entweder bei 300 V und höchstens 2 mA pro Zelle, oder über Nacht bei 75 V durchgeführt werden (jeweils bei 4 °C). In Tabelle 4.51 ist die Zusammensetzung des Elektroelutionspuffers aufgeführt.

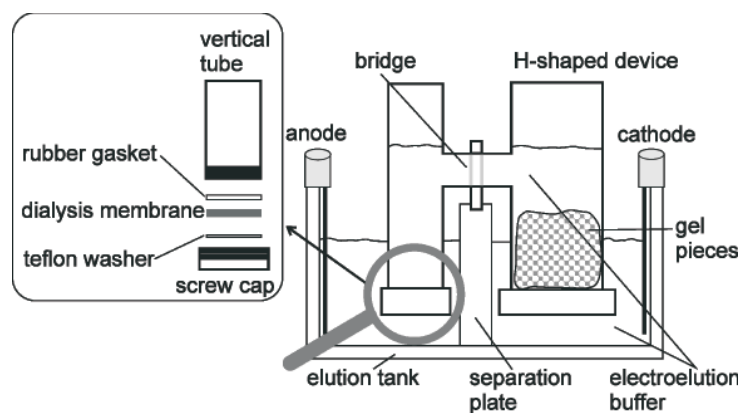


Abbildung 4.19: Schematischer Aufbau einer Elektroelutionszelle und -kammer. Die Migration der Proteine aus den Gelstückchen durch den Elektroelutionspuffer verläuft von rechts beginnend (Kathode) über die Brücke zur Anode (links). Hier findet die Konzentrierung der eluierten Proteine auf einer Dialysemembran statt ^[65].

Tabelle 4.51: Zusammensetzung des Elutionspuffers für die Elektroelution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen.

Elektroelutionspuffer	
$2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Tricin
$2,5 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	6-Aminocaprinsäure
$7,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	Bis-Tris
pH 7,0	stellt sich ein

Nach der Elution saugt man die auf der Dialysemembran konzentrierten Proteine vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette ab und engt das Volumen per Ultrafiltration weiter ein (ausführliche Beschreibung siehe Heidrich (2007) ^[69]).

4.12 Fluoreszenzmarkierung von Proteinkomplexen

Eine weitere Methode zur Sichtbarmachung von Proteinen in PA-Gelen wird durch Markierung dieser mit Fluoreszenzfarbstoffen erreicht. Die Bindung des Farbstoffs, der als *N*-Hydroxysuccinimid-Ester vorliegt (NHS-Ester), erfolgt durch Reaktion mit der α -Aminogruppe des N-Terminus oder der ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten, die sich hauptsächlich in Intermembran-Domänen von Membranproteinen befinden ^[99]. Das Reaktionsschema von NHS-Estern mit primären oder sekundären Aminen zum jeweiligen Amid bzw. Imid ist in folgender Abbildung dargestellt.

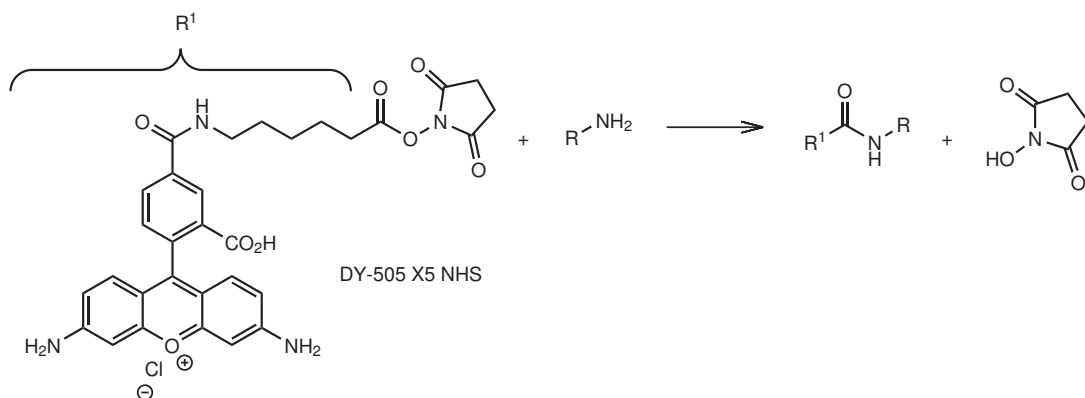


Abbildung 4.20: Reaktionsschema des Fluoreszenzfarbstoffs DY-505 X5 (NHS-Ester) mit einem primären Amin, modifiziert nach Hermanson (1996) ^[100]. Die Bindung dieses Farbstoffs erfolgt an die α -Aminogruppe des N-Terminus und an die ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten von Membranproteinen ^[99].

Die Durchführung der Fluoreszenzfärbung erfolgt wie in Heidrich (2007) ^[69] beschrieben. Der ursprünglich verwendete Puffer enthält als Pufferreagens das primäre Amin Tris. Hierdurch besteht die Gefahr, dass der Fluoreszenzfarbstoff nicht nur an die entsprechenden Bereiche von Proteinen bindet, sondern auch Konkurrenzreaktion mit dem eigentlich inerten Puffer eingeht. Aus diesem Grund findet ein Austausch der Puffersubstanz Tris gegen das tertiäre Amin Bicin statt. Die Zusammensetzung des Puffers ist in nachfolgender Tabelle dargestellt.

Tabelle 4.52: Zusammensetzung des BMK-Puffers für die Fluoreszenzfarbstoff-Markierung von Membranproteinen.

BMK-Puffer	
30 % (w/v)	Glycerin
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	Bicin
$1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$
$2 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	KCl
pH 8,5	einstellen

Die Markierung von Rinderherzmitochondrien mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-505 X5 erfolgt sowohl vor als auch nach der Solubilisierung. 40 µg BHM werden mit 160 µL BMK-Puffer versetzt und mit jeweils 0,4, 0,8, 1,6 und 3,2 µL des Farbstoffs ($1 \text{ nmol } \mu\text{L}^{-1}$) für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion des NHS-Esters stoppt man durch Zugabe von 1 µL L-Lysin ($1 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). Das Absorptionsmaximum des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs liegt bei 505 nm, das Emissionsmaximum bei 530 nm. Nach der im Dunkeln durchgeführten Elektrophorese erfolgt die Dokumentation des PA-Gels mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS-3000 von FujiFilm. Es wird eine Anregungswellenlänge von $\lambda_{\text{Ex}} = 470 \text{ nm}$ per Filter eingestellt (Emissionsfilter 515 nm).

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Anzucht und Aufschluss der Organismen

5.1.1 *C. reinhardtii*

Die Grünalge *C. reinhardtii*, bei der es sich hier um eine zellwanddefizitäre Mutante handelt (cw-15), wird entsprechend Abschnitt 4.1.1 sowohl photomixotroph als auch photoautotroph angezogen. Für photomixotrophes Wachstum wird dem Anzuchtmedium Acetat zugesetzt, das Medium für photoautotrophe Anzuchten enthält dagegen kein Acetat, sondern hohe Konzentrationen verschiedener Mineralsalze. Die Ausbeuten an isolierten Zellen unterscheiden sich hierbei in Abhängigkeit der Anzuchtbedingungen. Unter photomixotrophen Wachstumsbedingungen erhält man aus einem 15-Liter-Ansatz etwa 50 g Zellen (Feuchtmasse). Ein entsprechender Ansatz unter photoautotrophen Bedingungen ergibt eine Zellmasse von etwa 35 g. Nach dem mechanischen Aufschluss der Zellen mit Glaskugeln werden Chloroplasten und Mitochondrien mittels Differentialzentrifugation separiert. Der Anteil an Mitochondrien ist dabei für photomixotrophe Anzuchten deutlich höher als unter photoautotrophen Bedingungen. Aus diesem Grund wird bei photoautotroph angezogenen Kulturen meistens nur die Chloroplasten-Fraktion isoliert. Da zur Ermittlung der Organellen-Konzentration der Chlorophyllgehalt gemessen wird, sollte dieser bei mitochondrialen Fraktionen immer kleiner sein als der Wert für die Chloroplasten. Meistens liegt der Chlorophyllgehalt für Mitochondrien-Fraktionen im ähnlichen Bereich wie für Chloroplasten, was natürlich für einen hohen Anteil an Chloroplasten in der Mitochondrien-Fraktion spricht. Durch den Einsatz der Differentialzentrifugation kann nur eine grobe Trennung der beiden Organellen erfolgen. Deshalb nutzt man die auf Chloroplasten zurückzuführende Chlorophyllkonzentration in der Mitochondrien-Fraktion als Maß für die darin enthaltenen Mitochondrien. Bei erfolgreichen Anzuchten erhält man Chlorophyllkonzentrationen zwischen 2 und 3 mg mL⁻¹, sowohl für Chloroplasten als auch für Mitochondrien. Tabelle 5.1 (Seite 74) zeigt eine Übersicht über alle durchgeführten Anzuchten von *C. reinhardtii* und damit einhergehende Isolierungen an Chloroplasten und Mitochondrien. Aufgrund des langsameren Wachstums und der niedrigeren Zellausbeute bei photoautotroph wachsenden *C. reinhardtii*-Algen erfolgt neben Isolierungen aus 5-Liter-Ansätzen auch die Isolierung aus dauerbelichteten Vorkulturen (500 mL Algenkultur aus Inkubationsschüttler). Für vergleichende Analysen werden ebenfalls photomixotroph angezogenen Zellen aus dauerbelichteten Vorkulturen präpariert. Im Fall der dauerbelichteten photoautotrophen Vorkultur stellt man eine Erhöhung der Chlorophyllkonzentration für die Chloroplasten und eine Erniedrigung der Mitochondrienkonzentration gegenüber photoautotroph angezogenen Zellen im hell/dunkel-Rhythmus fest (siehe Tabelle 5.1, Isolierungen vom 02.02.2010 und 19.03.2010). Die isolierten Organellen werden à 500 µL aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Es besteht die Gefahr, dass durch das Einfrieren und Auftauen von Proben Veränderungen im Proteinmuster auftreten können. Aus

diesem Grund werden kleine Aliquotierungsmengen gewählt, sodass häufiges Auftauen und Einfrieren der Organellen vermieden wird. Allerdings stellt man keine signifikanten Unterschiede zwischen solubilisierten Proben direkt nach der Isolierung oder nach etwa einmonatiger Lagerung bei -80°C fest.

Tabelle 5.1: Übersicht über alle Präparationen von *C. reinhardtii*. Aufgrund sehr geringer Ausbeuten an Mitochondrien werden diese bei photoautotrophen Anzuchten nicht immer isoliert. Bei den Isolierungen vom 28.04.2008, 02.05.2008 und 24.09.2008 werden Chloroplasten und Mitochondrien gemeinsam sedimentiert und der Gesamtgehalt an Chlorophyll gemessen.

Datum	Anzuchtart	Belichtung	Chlorophyllkonzentration [mg mL^{-1}]	
			Chloroplasten	Mitochondrien
08.08.2005	photomixotroph	hell/dunkel	2,26	2,29
06.10.2006	photoautotroph	hell/dunkel	2,7	nicht isoliert
15.12.2006	photomixotroph	hell/dunkel	2,3	2,2
02.03.2007	photoautotroph	hell/dunkel	2,9	nicht isoliert
10.09.2007	photomixotroph	hell/dunkel	2,05	0,59
10.12.2007	photomixotroph	hell/dunkel	2,27	2,34
27.02.2008	photomixotroph	hell/dunkel	1,07	0,07
27.02.2008	photoautotroph	hell/dunkel	1,16	nicht isoliert
28.04.2008	photomixotroph	hell/dunkel		1,98
02.05.2008	photoautotroph	hell/dunkel		1,4
24.06.2008	photomixotroph	hell/dunkel	1,7	0,16
24.09.2008	photomixotroph	hell		1,66
28.01.2010	photomixotroph	hell/dunkel	2,72	2,04
02.02.2010	photoautotroph	hell/dunkel	0,72	0,28
19.03.2010	photoautotroph	hell	1,82	0,14

5.1.2 *E. gracilis*

E. gracilis-Zellen werden entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 4.2.2 photomixotroph und im 12 h hell/dunkel-Belichtungsrythmus angezogen. Die Ausbeute an Zellen ist im Vergleich zu *C. reinhardtii* deutlich höher (etwa 200 g Feuchtzellenmasse bei einem 15-Liter-Ansatz). Vor dem mechanischen Aufschluss von *E. gracilis* mit Glaskugeln muss die proteinreiche Pellikula, die der Plasmamembran aufgelagert ist, mit Hilfe von Trypsin angedaut werden, wodurch die Bildung von Sphäroblasten eingeleitet wird. Nach 45 minütiger Inkubation bei 0°C beendet man die weitere Bildung von Sphäroblasten durch Inhibierung des Trypsins (Zugabe von Trypsin-Inhibitor im Überschuss). Chloroplasten und Mitochondrien werden nach dem mechanischen Aufschluss der angedauten *E. gracilis*-Zellen per Differentialzentrifugation separiert. Hierbei befindet sich an der Oberfläche der jeweiligen Überstände eine weißliche Schicht, bei der es sich um Paramylon (β -D-(1 \rightarrow 3)-Glucan) handelt und die verworfen wird. Analog zu Stärke in Pflanzen dient Paramylon bei *E. gracilis* als Energiespeicher. Zur Ermittlung der jeweiligen Organellen-Konzentrationen werden Chlorophyllbestimmungen durchgeführt. Sowohl für die

Chloroplasten als auch für die Mitochondrien werden optimalerweise Chlorophyllgehalte zwischen 2 und 3 mg mL⁻¹ erhalten. Häufiges Auftauen und wieder Einfrieren der bei -80 °C gelagerten Organellen wird durch Aliquotierung der Proben in kleine Volumina vermieden (500 µL pro Aliquot). Tabelle 5.2 zeigt eine Übersicht über alle Anzuchten von *E. gracilis* und die daraus resultierenden Chlorophyll-Konzentrationen der isolierten Organellen. Die niedrigeren Chlorophyll-Gehalte der präparierten Chloroplasten und Mitochondrien vom 12.08.2009 resultieren aus dem geringeren Zellvolumen einer dauerbelichteten Vorkultur (ca. 500 mL).

Tabelle 5.2: Übersicht über alle Chloroplasten- und Mitochondrien-Isolierungen aus *E. gracilis*. Bei der Präparation vom 12.08.2009 werden die Zellen aus einer dauerbelichteten Vorkulturflasche (etwa 500 mL) isoliert. Das geringere Aufschlussvolumen hat eine Erniedrigung der Chlorophyllkonzentrationen für Chloroplasten und Mitochondrien zur Folge.

Datum	Anzuchtart	Belichtung	Chlorophyllkonzentration [mg mL ⁻¹]	
			Chloroplasten	Mitochondrien
13.11.2007	photomixotroph	hell/dunkel	1,79	1,39
16.06.2009	photomixotroph	hell/dunkel	2,6	2,8
12.08.2009	photomixotroph	hell	1,75	1,48

5.1.3 *A. longa*

Die farblose Verwandte von *E. gracilis*, *A. longa*, wird heterotroph im Dunkeln angezogen. Die Isolierung erfolgt in analoger Weise zu der von *E. gracilis*. Sowohl die separierten Zellen zu Beginn, als auch die isolierten Mitochondrien am Ende der Präparation, weisen eine leicht orangene Farbe auf. Nach proteolytischer Vorbehandlung der Plasmamembran mit Trypsin und mechanischem Aufschluss der Zellen erfolgt die Isolierung von Mitochondrien per Differentialzentrifugation. Aus ca. 400 mL einer sieben Tage alten Vorkultur werden auf diese Weise etwa 18 mL Mitochondriensuspension erhalten. Auf Grund der fehlenden Chloroplasten der nicht photosynthetisch aktiven Zellen von *A. longa*, wird zur Ermittlung der Konzentration keine Chlorophyllbestimmung, sondern eine kolorimetrische Proteinbestimmungen durchgeführt. Hierbei wird eine Proteinkonzentration von 2 mg mL⁻¹ gemessen. Die Lagerung der Organellen erfolgt in 500 µL Aliquots bei -80 °C. Ein quantitativer Vergleich zwischen *E. gracilis* und *A. longa* ist auf Grund der unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und dem Fehlen von Chloroplasten bei *A. longa* zwar schwierig, aber qualitativ kann gesagt werden, dass die Zell- und damit auch die Mitochondrienausbeute bei *E. gracilis* höher ist als bei *A. longa*.

5.1.4 *N. muscorum* und *C. paradoxa*

Erfahrungsgemäß^[19] wachsen das Cyanobakterium *N. muscorum* sowie die Glaucophyte *C. paradoxa* in kleineren Volumina besser als in 5-L-Kulturansätzen. Aus diesem Grund werden die Zellen aus einer drei Wochen alten Vorkultur (etwa 400 mL) isoliert, die unter Dauerbelichtung gewachsen ist. Die Präparation von *N. muscorum* und *C. paradoxa* erfolgt wie in Abschnitt 4.2.4 bzw. 4.2.5 beschrieben. Hierbei ist es für den Aufschluss der Zellen wichtig, im Falle von

N. muscorum eine Vorbehandlung mit DNase I durchzuführen und die Zellen von *C. paradoxa* osmotisch aufzubrechen. Im Vergleich zu Zellpräparationen aus Grünalgen werden die Zellen dieser beiden Organismen intensiver (4 Zyklen à 2 min bzw. 8 Zyklen à 30 s) mechanisch mit Glaskügelchen aufgeschlossen. Analog zu Grünalgenpräparationen wird der Gehalt an Thylakoiden per Chlorophyllbestimmung gemessen. Hierbei wird für *N. muscorum* eine Thylakoid-Konzentration von $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$ erhalten, die Konzentration der Cyanellen aus *C. paradoxa* liegt bei $13,6 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Die Proben werden zu jeweils $300 \text{ } \mu\text{L}$ aliquotiert und bei $-80 \text{ } ^\circ\text{C}$ gelagert.

5.2 Solubilisierung von Thylakoidmembranen

5.2.1 Solubilisierung von Thylakoidmembranen aus *C. reinhardtii*

Wie bereits aus anderen Arbeiten bekannt, z. B. ^[36,101], eignet sich das milde Detergens Digitonin zur Solubilisierung von Membranproteinen aus Thylakoiden der Grünalge *C. reinhardtii*. Die Solubilisierung mit Digitonin verläuft unter Erhalt der nativen Struktur von Proteinkomplexen und Superkomplexen. Für Untersuchungen von Enzymaktivitäten sowie zur elektronenmikroskopischen Analyse von Superkomplexstrukturen erfolgen somit alle Solubilisierungen mit diesem milden Detergens.

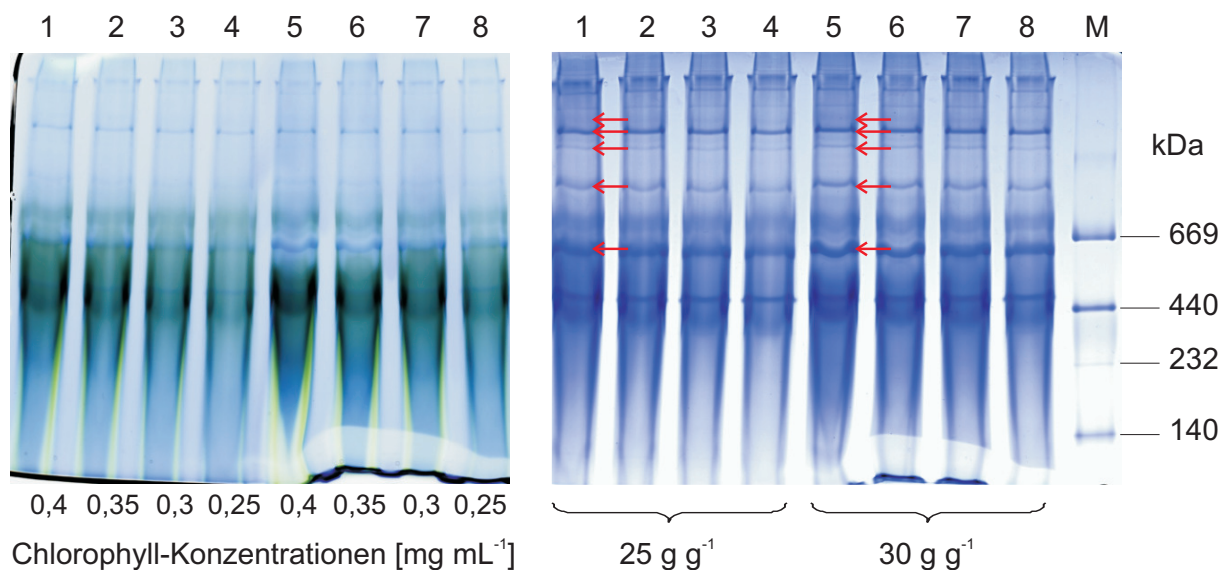


Abbildung 5.1: Mini-BN-Gel solubilisierter Mitochondrien aus *C. reinhardtii*. Das Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis beträgt für die Spuren 1–4 25 g g^{-1} , für die Spuren 5–8 30 g g^{-1} . Die aufgetragenen Chlorophyllkonzentrationen werden in $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ Schritten von $0,4$ auf $0,25 \text{ mg mL}^{-1}$ reduziert (Auftragsvolumen jeweils $30 \text{ } \mu\text{L}$). Links ist das ungefärbte, direkt nach der Gelelektrophorese dokumentierte Gelbild gezeigt, rechts dasselbe Gel nach Coomassie-Färbung. Als Proteinmarker wird hier der HMW verwendet (M). Mit 30 g g^{-1} Digitonin kann eine erhöhte Solubilisierungseffizienz für verschiedene Protein(supr)komplexe festgestellt werden (rote Pfeile).

Es werden Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnisse von 25 g g^{-1} sowie 30 g g^{-1} bei verschiedenen Chlorophyllkonzentrationen eingesetzt ($0,25 - 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$). Zu analytischen Zwecken werden niedrigere Konzentrationen an Solubilisat gelelektrophoretisch getrennt, für präparati-

ve Untersuchungen Solubilisate mit höheren Konzentrationen. Abbildung 5.1 zeigt ein Mini-BN-Gel ($T = 3,5\text{--}12\%$) mit solubilisierten Mitochondrien aus einer photomixotrophen *C. reinhardtii* Anzucht. Das ungefärbte, direkt nach der Elektrophorese dokumentierte Gel lässt deutlich grün gefärbte Banden erkennen, welche auf Verunreinigungen durch Chloroplasten zurückzuführen sind. Trotz des geringen Unterschiedes bezüglich der hier eingesetzten Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnisse zeigt sich bei einem Verhältnis von 30 g g^{-1} eine höhere Bandeschärfe. Offensichtlich ist die Solubilisierungseffizienz hier höher, da im Coomassie gefärbten Gel viele Proteinkomplexbanden wie CF_0F_1 , das Monomer von Komplex I, $(\text{MF}_0\text{F}_1)_2$ sowie Superkomplexe intensiver gefärbt werden. In den Spuren (1) und (5) des Coomassie gefärbten Gels ist der Unterschied besonders gut zu erkennen (siehe Pfeile in Abbildung 5.1).

5.2.2 Solubilisierung von Thylakoidmembranen aus *E. gracilis*

Zur Solubilisierung von Thylakoidmembranen aus *E. gracilis* werden verschiedene Detergenzien verwendet. Es wird überprüft, ob andere Detergenzien als Digitonin für diesen Modellorganismus ebenfalls zur Solubilisierung von supramolekularen Proteinstrukturen befähigt sind. Das Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis beträgt 25 g g^{-1} mit einer jeweiligen Chlorophyllkonzentration von $0,4\text{ mg mL}^{-1}$. Es werden Membranproteine sowohl aus Chloroplasten als auch aus Mitochondrien mit den Detergenzien Triton X-100, DDM, DM, DDS, DS, Cymal 5, Cymal 6, ASB-C8 ϕ und Digitonin solubilisiert (siehe Tabelle 4.12 auf Seite 30 für Strukturformeln der Detergenzien). $20\text{ }\mu\text{L}$ des jeweiligen Solubisates werden auf Mini-BN-Gele aufgetragen und gelelektrophoretisch getrennt. Abbildung 5.2 zeigt jeweils das ungefärbte und das mit Coomassie gefärbte Gel der Chloroplasten- und Mitochondrienprobe aus *E. gracilis*. Betrachtet man zunächst die ungefärbten, direkt nach der Elektrophorese dokumentierten Gele, so fällt auf, dass das Solubilisierungsvermögen der verschiedenen Detergenzien für chlorophyllhaltige Proteinkomplexe sehr unterschiedlich ist. So erkennt man für die Detergenzien Triton X-100, DDM, DDS, Cymal 6 und ASB-C8 ϕ (Spuren (1), (2), (4), (7) und (8) der Chloroplastenprobe) keine grün gefärbten Bereiche zu Beginn des Trenngels. Die Spuren (3), (5), (6) und (9) dagegen weisen solche grünen Bereiche bei niedrigen Acrylamidkonzentrationen des Trenngels auf (DM, DS, Cymal 5 und Digitonin). Diese Detergenzien sind also in der Lage hochmolekulare Photosystemkomplexe in ihrer nativen Form zu solubilisieren. Bei stärkeren Detergenzien erfolgt eine Aufspaltung dieser Photosysteme in kleinere Proteinkomplexe, was das Auftreten grünlich gefärbter Bereiche im unteren Teil des Trenngels, also bei höheren Konzentrationen an Acrylamid, erklärt. Für die mit Chloroplastenproteinen verunreinigte Mitochondrienprobe ist dieser Sachverhalt ebenfalls festzustellen. Neben den chlorophyllhaltigen Photosystemproteinen können aber auch Unterschiede für andere Proteinbanden festgestellt werden. Vor allem für die Mitochondrienprobe ist auffällig, dass mit den Detergenzien DDM, DDS, Cymal 6 und ASB-C8 ϕ in den Spuren (2), (4), (7) und (8) eine Proteinbande sehr hoher Masse gleich zu Beginn des Trenngels zu sehen ist (siehe rote Pfeile in Abbildung 5.2). Offensichtlich handelt es sich hierbei allerdings nicht um einen Komplex-I-enthaltenden Superkomplex, da diese Bande im Test auf NADH-Dehydrogenase nicht gefärbt wird. Unter Benutzung der Detergenzien DS

und Digitonin zeichnet sich eine Proteinbande etwas unterhalb der oben beschriebenen Bande zu Beginn des Trenngels ab. Im Gegensatz zu der mit DS erhaltenen Bande, kann in der mittels Digitonin erhaltenen Proteinbande Komplex-I-Aktivität nachgewiesen werden (siehe rote Pfeile in Abbildung 5.3 links). In allen Spuren ist eine stark ausgeprägte Proteinbande auf Höhe des schwarzen Pfeils auszumachen, die nach Inkubation in Komplex-I-Testpuffer NADH-Dehydrogenase-Aktivität zeigt (links in Abbildung 5.3). Im Vergleich zu bereits durchgeführten *In-Gel*-Aktivitätstests solubilisierter Mitochondrien aus *E. gracilis*^[50], konnten hier ähnliche Ergebnisse bezüglich des Solubilisierungsvermögens unterschiedlicher Detergenzien erzielt werden. Auch hier führte die Verwendung von DDM als Detergens, im Unterschied zu Digitonin, zum Zerfall von Komplex-I-enthaltenden Superkomplexen.

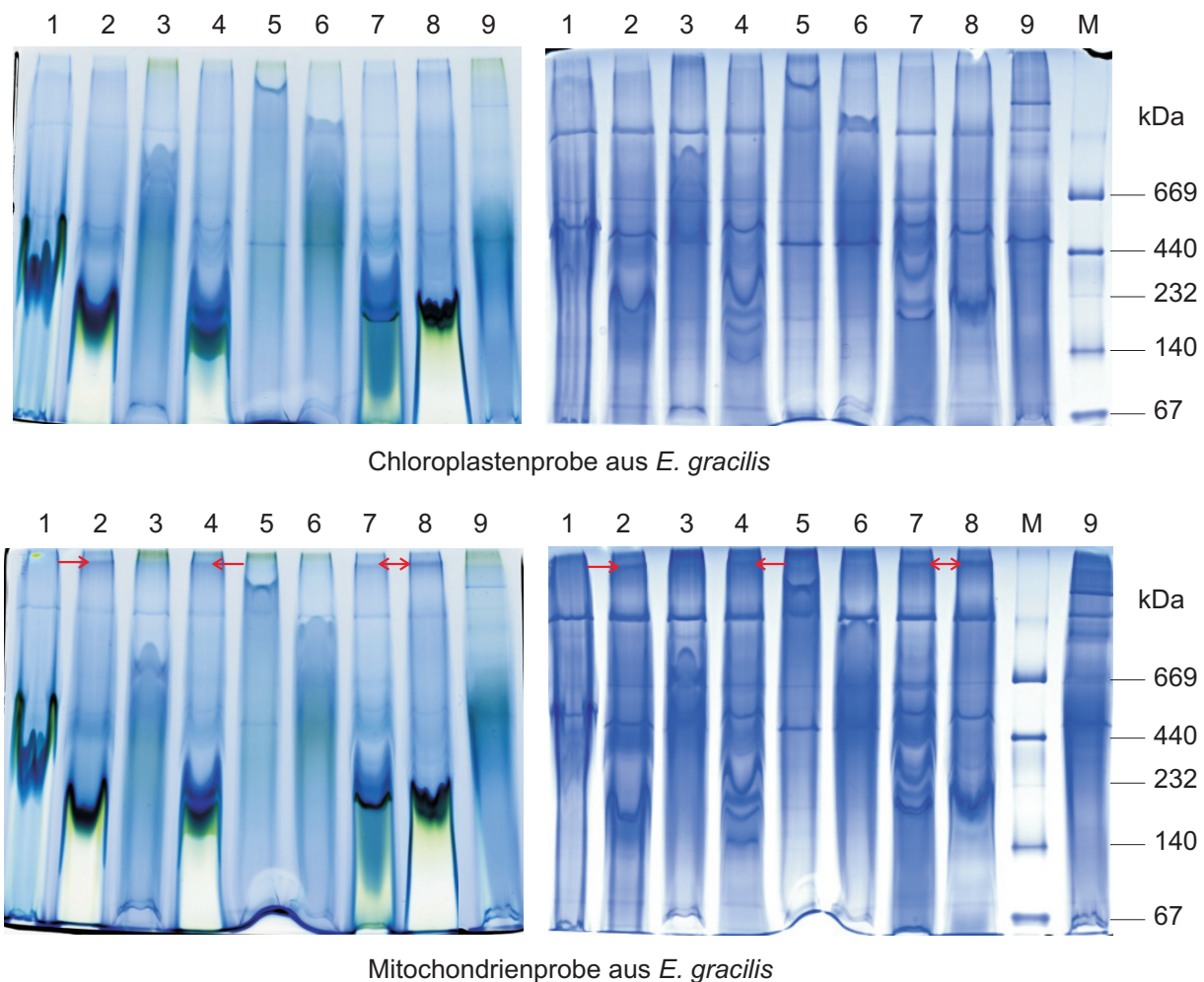


Abbildung 5.2: Mini-BN-Gele solubilisierter Chloroplasten und Mitochondrien aus *E. gracilis*. Das Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis beträgt 25 g g^{-1} bei einer Chlorophyllkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Es werden verschiedene Detergenzien pro Gelspur eingesetzt. (1) Triton X-100, (2) DDM, (3) DM, (4) DDS, (5) DS, (6) Cymal 5, (7) Cymal 6, (8) ASB-C8 ϕ , (9) Digitonin. Die roten Pfeile weisen auf einen hochmolekularen Proteinkomplex hin, der nur bei Solubilisierung mit DDM, DDS, Cymal 6 und ASB-C8 ϕ stabil ist. Die mit (M) bezeichneten Spuren enthalten jeweils den Proteinstandard HMW.

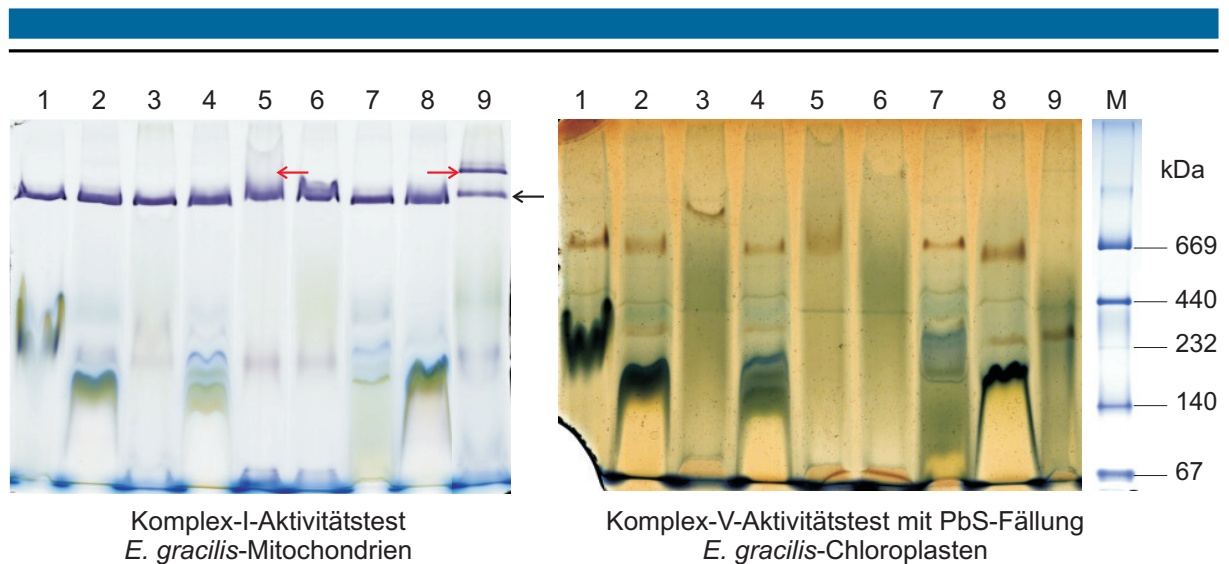


Abbildung 5.3: Mini-BN-Gele solubilisierter Mitochondrien (links) und Chloroplasten (rechts) aus *E. gracilis*. Das Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis beträgt 25 g g^{-1} bei einer Chlorophyllkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. Es werden verschiedene Detergenzien pro Gelspur eingesetzt. (1) Triton X-100, (2) DDM, (3) DM, (4) DDS, (5) DS, (6) Cymal 5, (7) Cymal 6, (8) ASB-C8 ϕ , (9) Digitonin. Links ist das Ergebnis nach Inkubation des Gels in Komplex-I-Aktivitätstestlösung gezeigt. Anders als mit DS, kann mit Digitonin für die mit roten Pfeilen markierte Bande Komplex-I-Aktivität festgestellt werden. Für alle Detergenzien ist auf Höhe des schwarzen Pfeils eine Bande sichtbar, die NADH-Dehydrogenase-Aktivität zeigt. Zur Sichtbarmachung der Hydrolyse von ATP durch Komplex V wird ein zweites Gel in Komplex-V-Testlösung mit anschließender PbS-Fällung inkubiert. Spur (M) enthält den Proteinstandard HMW.

Die Hydrolyse von ATP durch Komplex V mit anschließender PbS-Fällung zur Sichtbarmachung der ATP-Synthase im Gel funktioniert bei *E. gracilis* nicht mit allen Detergentien. DM, Cymal 5 und Digitonin sind zu mild, um die ϵ -Untereinheit der Chloroplasten-ATP-Synthase abzuspalten, wodurch die Hydrolyse von ATP möglich wird^[36]. Oligomere Formen der CF_0F_1 aus *E. gracilis* werden hier nicht beobachtet, sondern lediglich das Monomer der ATP-Synthase. Für weitere Analysen bezüglich Enzymaktivitäten und elektronenmikroskopischer Strukturaufklärung werden Thylakoidmembranen und Mitochondrien aus *E. gracilis* mit dem milden Detergens Digitonin solubilisiert. Hiermit lässt sich nach nativer Gelelektrophorese die Proteinzusammensetzung beider Organellenmembranen *in vivo* am wahrscheinlichsten beschreiben.

5.2.3 Solubilisierung von Membranen aus *A. longa*

Zur Untersuchung der farblosen Verwandten von *E. gracilis*, *A. longa*, bezüglich des Vorhandenseins supramolekularer Proteinkomplexe, werden verschiedene Detergenzien zur Solubilisierung der Mitochondrien eingesetzt. Hierbei beträgt die Proteinendkonzentration der Solubilisierungsansätze $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ bei einem Detergens-zu-Protein-Verhältnis von 12 g g^{-1} . Im Unterschied zu *E. gracilis* wird hier die Solubilisierung basierend auf der Proteinkonzentration durchgeführt. Deshalb ist eine Reduzierung der Detergenskonzentration, hier etwa eine Halbierung im Vergleich zu den üblichen Chlorophyll-zu-Detergens-Verhältnissen für Grünalgen, vonnöten. Die folgende Abbildung zeigt zwei Mini-BN-Gele mit solubilierten Mitochondrien aus *A. longa*. Das Beladungsvolumen beträgt jeweils $35 \text{ }\mu\text{L}$. Neben dem mit Coomassie gefärbten Gel ist auch ein Gel gezeigt, das auf NADH-Dehydrogenase-Aktivität untersucht wird.

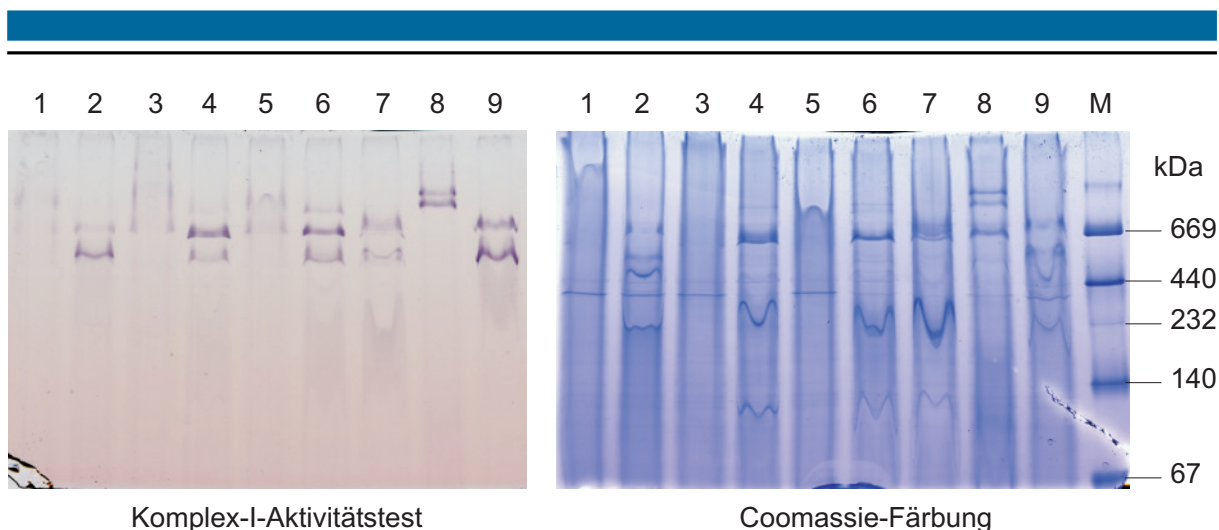


Abbildung 5.4: Mini-BN-Gele solubilisierter Mitochondrien aus *A. longa*. Das Detergens-zu-Protein-Verhältnis beträgt 12 g g^{-1} bei einer Proteinkonzentration von $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$. Es werden verschiedene Detergentien pro Gelspur eingesetzt: (1) Cymal 5, (2) Cymal 6, (3) DS, (4) DDS, (5) DM, (6) DDM, (7) ASB-C8 ϕ , (8) Digitonin, (9) Triton X-100. Links ist das Ergebnis nach Inkubation des Gels in Komplex-I-Aktivitätstestlösung gezeigt, rechts das Coomassie gefärbte Gel mit dem Proteinstandard HMW (M).

Bis auf die Spuren (1) und (3) (Cymal 5 und DS), sind überall nach Inkubation in Komplex-I-Testlösung gefärbte Banden zu erkennen. Die meisten Spuren enthalten zwei gefärbte Banden, die sich zwischen 669 kDa und 440 kDa bezüglich des HMW-Markers befinden. Ob diese Banden allerdings auf Komplex-I-Aktivität zurückzuführen sind ist fraglich, da die typische Masse von Komplex I in Eukaryonten von etwa 1000 kDa deutlich unterschritten wird. Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass Komplex I in *A. longa* weniger Untereinheiten besitzt und somit eine geringere Gesamtmasse aufweist wie beispielsweise in Bakterien (525 kDa, 14 Untereinheiten^[102]). Das DDM-Solubilisat lässt eine dritte Proteinbande etwas oberhalb 669 kDa erkennen. Nur bei Digitonin sind zwei Proteinbanden oberhalb von 669 kDa zu sehen, bei denen es sich entweder um das Monomer von Komplex I bzw. mit höherer Masse um einen Komplex-I-enthaltenden Superkomplex handeln kann, oder um zwei Superkomplexe wenn Komplex I in *A. longa* weniger Untereinheiten besitzt. Im Coomassie gefärbten Gel sind teilweise Banden, die Komplex-I-Aktivität aufweisen, sehr schwach gefärbt (jeweils die Bande oberhalb 440 kDa der Spuren (4), (6) und (7)). Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Sensitivität des *In-Gel*-Aktivitätstests im Vergleich zur Coomassie-Färbung höher ist. Aufgrund der Tatsache, dass lediglich mit Digitonin Proteinbanden im höheren Massenbereich erhalten werden, erfolgen alle weiteren biochemischen Analysen, denen die Solubilisierung von Mitochondrien aus *A. longa* voran geht, mit dem milden Detergens Digitonin.

5.2.4 Solubilisierung von Membranen aus *C. paradoxa* und *N. muscorum*

5.2.4.1 *C. paradoxa*

Die sehr niedrige Chlorophyllkonzentration der erhaltenen Cyanellen aus *C. paradoxa* von $13,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ führt dazu, dass zwei Solubilisierungsansätze variiert werden. Der wesentliche Unterschied zwischen beiden Ansätzen ist der Solubilisierungspuffer, der einmal weggelassen wird, um die Konzentration an Cyanellen nicht zu stark zu verdünnen, und einmal mitbenutzt wird, um eine annähernde Standardsolubilisierung durchzuführen. Beide Pipettieransätze sind in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tabelle 5.3: Solubilisierungsansätze für *C. paradoxa* mit einem Gesamtvolumen von jeweils 100 μL .

Ansatz ohne Solubilisierungspuffer		
Bestandteil	Volumen [μL]	Konzentration
Cyanellen	90	$12,24 \mu\text{g mL}^{-1}$
Digitonin	10	1 % (w/v)
Ansatz mit Solubilisierungspuffer		
Bestandteil	Volumen [μL]	Konzentration
Cyanellen	40	$5,44 \mu\text{g mL}^{-1}$
Digitonin	10	1 % (w/v)
Puffer-O (2x) mit NaCl	50	1x

Die hohen Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnisse (800 g g^{-1} im Ansatz ohne Puffer und 1830 g g^{-1} im Ansatz mit Puffer) werden deshalb so gewählt, um den schon geringen Anteil an Cyanellen möglichst effektiv unter nativen Bedingungen zu solubilisieren. Auf ein Mini-BN-Gel werden pro Tasche 25 μL des jeweiligen Solubilisierungsansatzes pipettiert und gelelektrophoretisch getrennt. Ein Teil des Gels wird mit Coomassie gefärbt, der andere Teil des Gels wird geblottet und mit primären Antikörpern gegen die Untereinheiten III und α der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat inkubiert. Die Detektion der immunologisch markierten Proteine erfolgt über eine Farbreaktion der an einem Sekundärantikörper konjugierten alkalischen Phosphatase. Das gefärbte Gel, sowie die Blotmembran sind in Abbildung 5.5 gezeigt. Aufgrund der niedrigen Chlorophyllkonzentration der solubilisierten Cyanellen, erscheinen die Proteinbanden im Coomassie gefärbten Mini-BN-Gel nur sehr schwach. Wie erwartet, sind die Banden der Solubilisierung mit Puffer (+) schwächer als im Solubilisierungsansatz ohne Puffer (–), da die Cyanellen-Konzentration im Ansatz mit Puffer um mehr als die Hälfte niedriger ist als ohne Puffer ($5,44 \mu\text{g mL}^{-1}$ gegenüber $12,24 \mu\text{g mL}^{-1}$). Der Einsatz des Solubilisierungspuffers führt allerdings zu einer höheren Bandenschärfe im Vergleich zu den Ansätzen ohne Puffer. Auch dies erscheint logisch, da der verwendete Solubilisierungspuffer zu einer Stabilisierung der Proteine, z. B. gegenüber Proteasen, beiträgt. Diese Proteasen führen im Solubilisierungsansatz ohne Puffer zu einem teilweisen Abbau von Proteinen, der sich in einer geringeren Bandenschärfe im Mini-BN-Gel äußert.

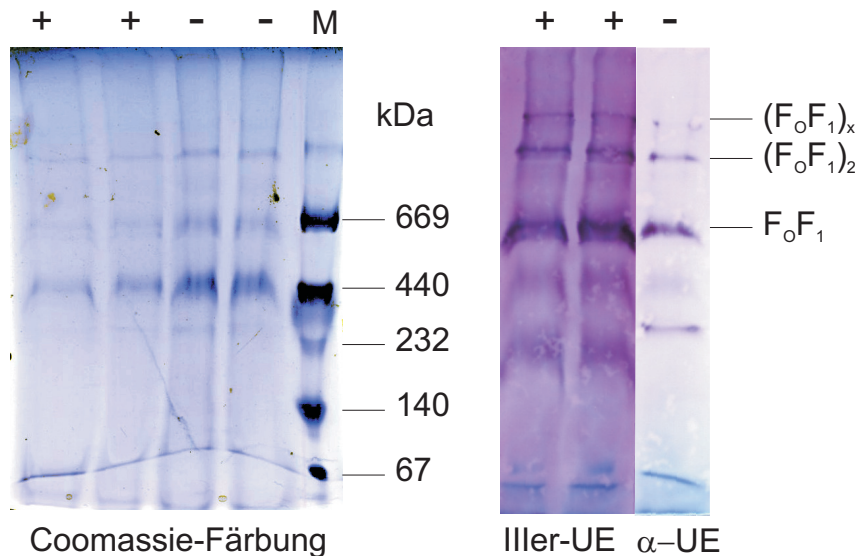


Abbildung 5.5: Links ist ein Mini-BN-Gel solubilisierter Cyanellen von *C. paradoxa* nach der Färbung mit Coomassie gezeigt (mit dem Proteinstandard HMW (M)). Der Western-Blot mit primären Antikörpern gegen die Untereinheiten III bzw. α der CF_0F_1 aus Spinat ist rechts zu sehen. Es werden 25 μL des jeweiligen Solubilisierungsansatzes (siehe Tabelle 5.3) mit (+) und ohne (-) Solubilisierungspuffer aufgetragen. Die Detektion des Western-Blots erfolgt mittels alkalischer Phosphatase.

Im gezeigten Western-Blot bestätigen sich die bereits gemachten Aussagen bezüglich beider Solubilisierungsansätze. Es werden primäre Antikörper gegen die Untereinheiten III und α der CF_0F_1 aus Spinat zur Markierung der ATP-Synthase in *C. paradoxa* verwendet. Trotz der niedrigeren Proteinkonzentration im Ansatz mit Puffer, erfolgt hier eine intensivere Färbung der immunologisch markierten Proteine. So ist auf Höhe der 669 kDa Markerbande eine stark gefärbte Bande festzustellen, bei der es sich vermutlich um das Monomer der ATP-Synthase aus *C. paradoxa* handelt. Diese Bande wird mit primären Antikörpern gegen die ATP-Synthase- α -UE im Solubilisierungsansatz ohne Puffer auch detektiert, allerdings vergleichsweise schwach, obwohl die Zugänglichkeit der α -UE, im Unterschied zur Untereinheit III, deutlich erleichtert sein sollte. Zusätzlich zum Monomer von F_0F_1 kann auch die dimere und eine oligomere Form der ATP-Synthase $((\text{F}_0\text{F}_1)_x)$ detektiert werden. Auch hier sind die bereits angesprochenen Intensitätsunterschiede bezüglich beider Solubilisierungen deutlich festzustellen. Es zeigt sich allerdings auch, dass die hohen Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnisse für beide Solubilisierungsansätze zum teilweisen Zerfall des Holoenzym in F_0 und F_1 führen (immunologisch detektierte Banden unterhalb von F_0F_1).

5.2.4.2 *N. muscorum*

Die Solubilisierung von Thylakoiden aus *N. muscorum* erfolgt unter Verwendung der Detergenzien Digitonin und DDM. Aufgrund der niedrigen Chlorophyll-Konzentration von $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$, muss der Solubilisierungsansatz entsprechend angepasst werden. Bezüglich der Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnisse werden die üblichen Mengen für eine Chlorophyll-Endkonzentration von $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ pipettiert (20 g g^{-1} für Digitonin, 25 g g^{-1} für DDM). Bei einer tatsächlichen Endkonzentration von $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$ im Solubilisierungsansatz ergeben sich

Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnisse von $83,3 \text{ g g}^{-1}$ für Digitonin und $104,2 \text{ g g}^{-1}$ für DDM. Das Pipettierschema der Solubilisierungsansätze ist in Tabelle 5.4 dargestellt.

Tabelle 5.4: Solubilisierungsansätze für *N. muscorum* mit einem Gesamtvolumen von jeweils 1,2 mL.

Solubilisierungsansatz mit Digitonin		
Bestandteil	Volumen [μL]	Konzentration
Thylakoide	300	$0,12 \text{ mg mL}^{-1}$
Digitonin	120	1 % (w/v)
Puffer-O (2x) mit NaCl	600	1x
mit 180 μL bidest. H_2O auf 1,2 mL auffüllen		
Solubilisierungsansatz mit DDM		
Bestandteil	Volumen [μL]	Konzentration
Thylakoide	300	$0,12 \text{ mg mL}^{-1}$
DDM	150	1,25 % (w/v)
Puffer-O (2x) mit NaCl	600	1x
mit 150 μL bidest. H_2O auf 1,2 mL auffüllen		

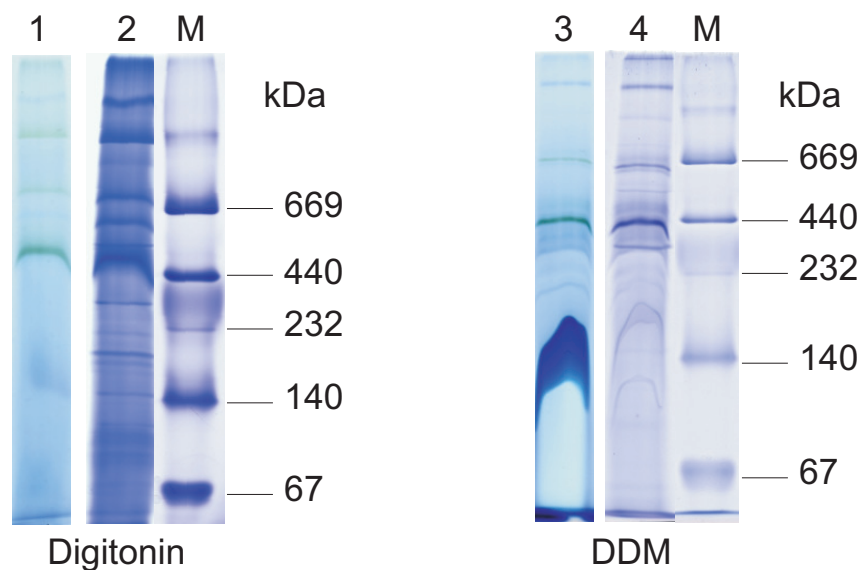


Abbildung 5.6: Mini-BN-Gele solubilisierter Thylakoide von *N. muscorum*. Als Detergenzien werden Digitonin (links) und DDM (rechts) mit Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnissen von $83,3 \text{ g g}^{-1}$ bzw. $104,2 \text{ g g}^{-1}$ verwendet. Die Chlorophyll-Konzentration der Solubilisierungsansätze beträgt $0,12 \text{ mg mL}^{-1}$. Die Spuren (1) und (3) zeigen die ungefärbten Solubisate für Digitonin bzw. DDM direkt nach der Elektrophorese, Spuren (2) und (4) die dazugehörigen mit Coomassie gefärbten Gelstreifen. Die Spuren (M) enthalten den Proteinstandard HMW.

Entsprechend der Solubilisierung von Cyanellen aus *C. paradoxa* sollen die hohen Konzentrationen an Detergens zu einer möglichst effektiven Solubilisierung der geringen Menge an Thylakoiden aus *N. muscorum* führen. In die Taschen von Mini-BN-Gelen werden jeweils $10 \mu\text{L}$ der Digitonin- bzw. DDM-Solubisate pipettiert und gelelektrophoretisch getrennt. Abbildung 5.6 zeigt die mit dem jeweiligen Solubisat beladenen Gelstreifen nach der Elektrophorese. Bei Betrachtung der ungefärbten Gelstreifen fällt auf, dass mit Digitonin drei grüne Protein-

komplexbanden sichtbar sind. Jeweils eine Photosystembande befindet sich etwas ober- bzw. unterhalb der 669 kDa Bande des HMW-Markers, die dritte noch etwas weiter im oberen Teil des Trenngels. Vergleichend mit dem ungefärbten Gelstreifen der DDM-Solubilisierung werden zwei grüne Banden festgestellt, die etwa auf Höhe der 440 kDa bzw. der 669 kDa Markerbande laufen. Im Gegensatz zu Digitonin ist DDM nicht mild genug, um hochmolekulare Photosystemkomplexe in ihrem nativen Zustand zu solubilisieren. Nach Anfärben der Gelstreifen mit Coomassie kann des Weiteren festgestellt werden, dass mit DDM zwar auch große Proteinkomplexe mit Massen nahe 1000 kDa erhalten werden, die Anzahl solcher Komplexe im Vergleich zur Solubilisierung mit Digitonin jedoch geringer ist. Außerdem scheint die Solubilisierungseffizienz von Digitonin im Vergleich zu DDM höher zu sein, da einzelne Proteinbanden in Spur (2) schärfer und intensiver wirken. Dieser Sachverhalt kann damit begründet werden, dass für das *per se* stärkere Detergens DDM, das Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis höher gewählt wurde als für Digitonin. Dadurch kann es zur teilweisen Denaturierung supramolekularer Proteinkomplexe in die entsprechenden Subkomplexe kommen, oder die Solubilisierung von Proteinkomplexen erfolgt nicht vollständig, sodass sich weniger intensive Proteinbanden im Gel abzeichnen.

5.3 Dichtegradientenzentrifugation

5.3.1 Aufreinigung von Organellen

Zur Aufreinigung von Organellen werden verschiedene Arten der Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt. Um negative Auswirkungen auf das Probenmaterial, z. B. osmotische Effekte, auszuschließen, ist die Wahl eines entsprechenden Gradientenmediums essentiell. Als geeignete Medien seien hier silicabeschichtete Polymerkügelchen, Percoll[®], oder Iodixanollösungen genannt. Im Folgenden werden Ergebnisse aus Dichtegradientenzentrifugationen mit Percoll[®] als Gradientenmedium vorgestellt. Aus einer photomixotroph angezogenen *C. reinhardtii*-Kultur werden Mitochondrien und Chloroplasten isoliert. Im Unterschied zur in Abschnitt 4.2.1 beschriebenen Präparationsmethode werden die Organellen gemeinsam sedimentiert und zur Abtrennung von Zelltrümmern sowie Glasperlen ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt nach dem mechanischen Aufschluss durchgeführt (5 min, $150 \times g$). Die Sedimentation des Organellengemisches erfolgt für 60 min bei $10000 \times g$. Zur Reinigung dieser Mischung werden zwei lineare Percoll[®]-Dichtegradienten im Bereich von 10 bis 80 % (w/v) in SW-28-Zentrifugenröhrchen gegossen (siehe Abschnitt 4.4.2.1, Seite 36). Diese Gradienten werden mit jeweils 3 mL Organellen-Suspension beladen und eine halbe Stunde bei $6000 \times g$ zentrifugiert. Im Anschluss daran erfolgt die Dokumentation beider Gradientenröhrchen und die Fraktionierung der Lösungen, wobei gleiche Fraktionen des jeweiligen Röhrchens vereint werden. Abbildung 5.7 zeigt beide Zentrifugenröhrchen nach der Zentrifugation mit der entsprechenden Fraktionseinteilung.

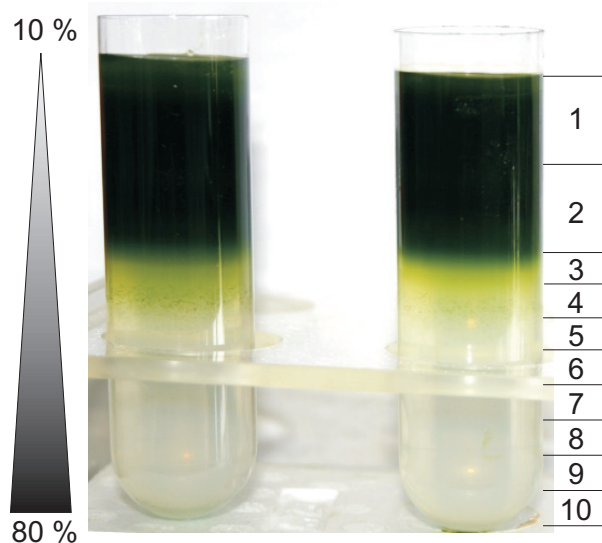


Abbildung 5.7: Linearer Percoll®-Dichtegradient eines Organellengemischs aus *C. reinhardtii*. Die Konzentration an Percoll® steigt von 10 % (w/v) am Meniskus der Lösung auf 80 % (w/v) am Röhrchenboden. Die Gradienten werden mit je 3 mL der Probensuspension beladen. Jeweils entsprechende Fraktionen aus beiden Röhrchen werden vereint. Insgesamt erhält man 10 Fraktionen.

Vom Meniskus der Lösung bis etwa zur Hälfte des SW-28-Röhrchens erkennt man einen stark grün gefärbten Abschnitt, der im wesentlichen Chloroplasten enthalten sollte. Die Breite dieses grünen Abschnitts spricht allerdings dafür, dass ein Großteil der isolierten Chloroplasten nicht mehr intakt ist. Unbeschädigte Chloroplasten müssten aufgrund ihrer Größe nicht zu Beginn des Gradienten sichtbar sein, sondern bei höheren Konzentrationen des Gradientenmediums. Umgekehrt sollten Mitochondrien, die wesentlich kleiner als Chloroplasten sind, bereits bei geringen Percoll®-Konzentrationen zu finden sein. An den dunkelgrünen Bereich des Gradienten schließt sich ein hellgrünes Band an, das mit kleinen grünen Partikeln versetzt ist. Hierbei könnte es sich um nicht aufgeschlossene Zellen aus *C. reinhardtii* handeln, die bei der Isolierung zusammen mit den Chloroplasten sedimentiert wurden. Die Lösung im unteren Drittel des Röhrchens ist farblos. Zur weiteren Analyse der gesammelten Fraktion muss vor der Solubilisierung der Organellen eine Percoll®-Entfernung vorgenommen werden. Hierzu pipettiert man 100 µL der jeweiligen Fraktion zu 1,2 mL Gradientenpuffer (2x), der mit 5 % (w/v) Glycerin versetzt wird (siehe Tabelle 4.18, Seite 36). Durch Zentrifugation dieser Mischung für 10 min bei $10000 \times g$ bleibt das Percoll® im Überstand und das Sediment enthält die jeweiligen gereinigten Organellen. Diese Pellet wird in 100 µL Gradientenpuffer (2x) resuspendiert, sodass ein Endvolumen von ca. 120 µL resultiert, welches abschließend mit 1 % (w/v) Digitonin (10 %ige Stammlösung) solubilisiert wird. Das Solubilisat kann nun gelelektrophoretisch untersucht werden. Jeweils 20 µL der solubilisierten Fraktionen aus dem Dichtegradienten werden per BN-PAGE aufgetrennt. Lediglich für die Fraktionen 1–5 können im BN-Gel Proteinbanden festgestellt werden (Abbildung 5.8). Fraktion 1 und 2 stammen aus dem stark grün gefärbten Abschnitt zu Beginn des Gradienten. Die hellgrünen Bereiche darunter (Fraktionen 3–5) enthalten auch Proteine, jedoch im Vergleich zu den ersten beiden Fraktionen deutlich weniger. Der farblose Abschnitt im unteren Teil des Gradienten dagegen enthält überhaupt keine Proteine,

wie die mit Coomassie gefärbten Spuren im BN-Gel zeigen (Fraktionen 6-10). Die Fraktionen 1–5 werden im BN-Gel auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht, und es zeigt sich, dass in den Fraktionen 1–4 Komplex I Monomer zu finden ist (etwas oberhalb der 669 kDa Markerbande des HMW). Bei genauerer Betrachtung erkennt man in den Spuren der Fraktionen 1 und 2 auch ganz schwach gefärbte Banden, die auf Komplex-I-enthaltende Superkomplexe hinweisen. Die mit Fraktion 5 beladene Spur zeigt dagegen keinerlei Aktivität der NADH-Dehydrogenase.

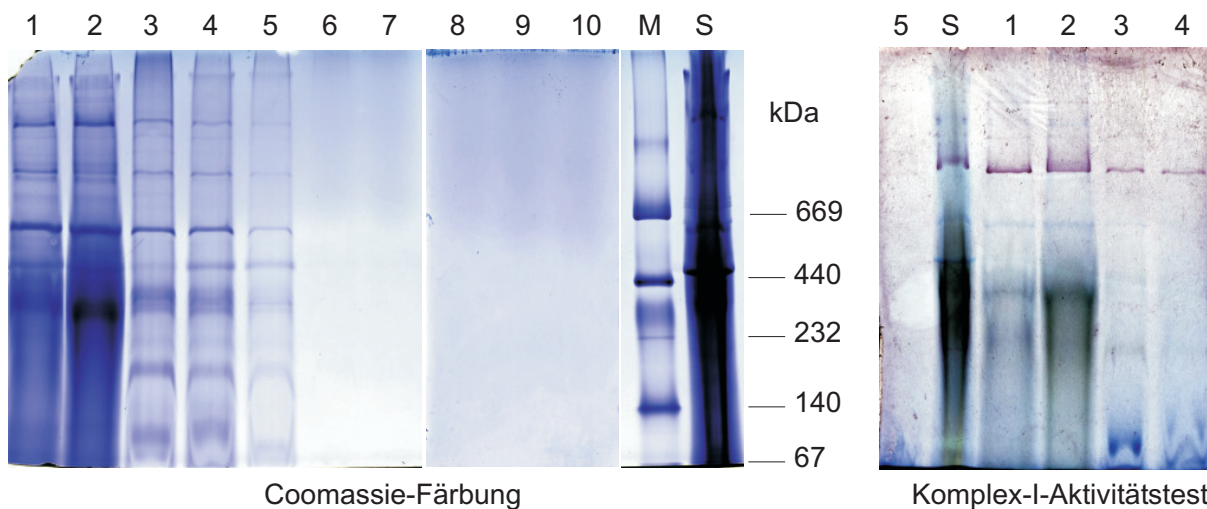


Abbildung 5.8: Fraktionen 1–10 des linearen Percoll®-Dichtegradienten eines Organellengemisches aus *C. reinhardtii* aufgetragen auf ein Mini-BN-Gel. Neben den einzelnen solubilisierten Fraktionen werden ebenfalls das Solubilisat des Gemisches (S) sowie der Proteinstandard HMW (M) aufgetragen. Fraktionen 1–10 werden mit Coomassie gefärbt und zusätzlich die Fraktionen 1–5 auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht. Pro Spur werden 20 µL Probe aufgetragen.

Die Tatsache, dass in fast allen Protein-enthaltenden Fraktionen (1–4) des Dichtegradienten Komplex-I-Aktivität nachzuweisen ist, spricht für eine schlechte Aufreinigung des Organellengemisches und einen hohen Anteil an beschädigten Chloroplasten. Aufgrund dieser Beschädigung erfolgt die Sedimentierung der Chloroplasten-Fragmente in ähnlichen Bereichen wie die Sedimentierung von Mitochondrien, sodass zwischen diesen Organellen keine Trennung per Dichtegradient erreicht werden kann. Vergleicht man die Fraktionen 1–4 im Coomassie gefärbten Gel miteinander, so stellt man trotz der schlechten Auftrennung neben Intensitätsunterschieden auch kleine Abweichungen im Proteinmuster fest. Die Fraktionen 1 und 2 weisen etwas ober- und unterhalb der Komplex-I-Monomerbande jeweils eine schwache Proteinbande auf, die beide in den Fraktionen 3 und 4 fehlen. Ein deutlicher Unterschied bezüglich der Bandenintensität ist für das vermutliche Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase festzustellen. Diese Bande ist in den Fraktionen 1 und 2 sehr viel stärker sichtbar als in den Fraktionen 3–5. Es kann also schon von einer gewissen Auftrennung beider Organellen gesprochen werden, auch wenn diese nicht optimal verlaufen ist. Neben dem beschriebenen hohen Anteil beschädigter Chloroplasten kann sich der große Konzentrationsbereich von 10 bis 80 % (w/v) an Percoll® negativ auf die Trennleistung auswirken. Diese hohe Konzentration sorgt möglicherweise dafür, dass die Dichtegradientenzentrifugation isopyknisch verläuft, d. h. die höchste Dichte des Gradientenmediums ist größer als die höchste Dichte der Probenpartikel.

Somit stehen die Teilchen mit der entsprechenden Dichte im Medium im Gleichgewicht. Bei zu hoch gewählten Dichten des Mediums reduziert man jedoch die Trennleistung, da nicht die gesamte Röhrchenlänge ausgenutzt wird und die Partikel schon nach einer kurzen Strecke nicht weiter sedimentieren können. Es bleibt allerdings fraglich, ob bei der hier durchgeführten Dichtegradientenzentrifugation von einer Gleichgewichtszentrifugation gesprochen werden kann, da die Dauer der Zentrifugation von 30 min relativ kurz ist und nicht auszuschließen ist, dass eine Erhöhung der Zentrifugationsdauer mit einer Erhöhung der Trennleistung einhergeht. Aus diesem Grund erfolgt eine erneute Gradientenzentrifugation mit veränderten Zentrifugationsparametern bezüglich der RZB und der Dauer der Zentrifugation. Entsprechend der in Abschnitt 4.4.2.2 beschriebenen Methode werden zwei SS-34-Zentrifugenröhrchen mit jeweils 16 mL Gradientenmedium (2x) und dem gleichen Volumen an Percoll® (100 % (w/v)) befüllt. Hier wird die Eigenschaft von Percoll® genutzt, einen Gradienten per Zentrifugation ausbilden zu können. Somit wird das Puffer/Percoll®-Gemisch zur Ausbildung des Dichtegradienten 90 min bei $23700 \times g$ zentrifugiert. Die Gradienten werden anschließend mit jeweils 3,5 mL eines Organellengemisches einer photomixotrophen Anzucht von *C. reinhardtii* beladen und eine Stunde bei gleicher RZB zentrifugiert. Das Ergebnis der Dichtegradientenzentrifugation ist in Abbildung 5.9 dargestellt.

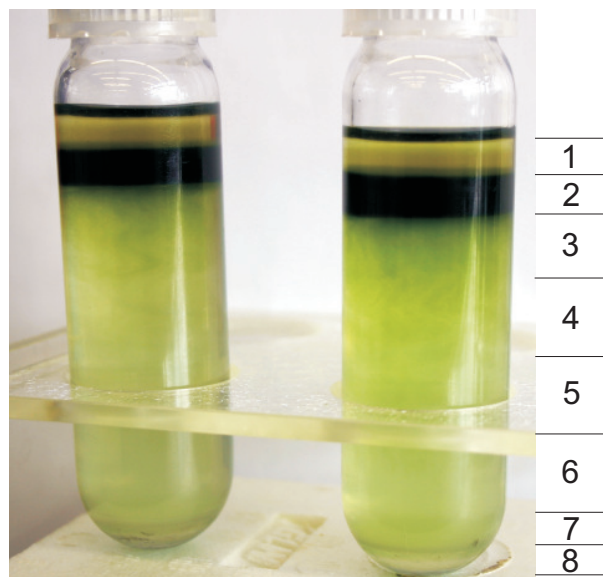


Abbildung 5.9: Per Zentrifugation generierter, linearer Percoll®-Dichtegradient eines Organellengemischs aus *C. reinhardtii*. Zur Generierung des Gradienten werden gleiche Volumina an Gradientenmedium (2x) und Percoll® (100 % (w/v)) gemischt und 90 min bei $23700 \times g$ zentrifugiert. Die Gradienten werden mit je 3,5 mL der Probensuspension beladen. Jeweils entsprechende Fraktionen aus beiden Röhrchen werden vereint. Insgesamt erhält man 8 Fraktionen.

Insgesamt wird der Gradient in 8 Fraktionen eingeteilt und gleiche Fraktionen vereint. Auffällig ist diesmal eine schmale, intensiv grün gefärbte Bande zu Beginn des Gradienten (Fraktion 2). Darunter ist die Gradientenlösung relativ gleichmäßig hellgrün bis zum Boden des Röhrchens gefärbt. In Fraktion 7 ist zusätzlich eine weiße schmale Bande zu sehen. Die Percoll®-Entfernung sowie die Solubilisierung der einzelnen Fraktionen erfolgt analog zu der oben be-

schriebenen Durchführung. Zur genaueren Analyse werden jeweils 20 µL der Solubilisate auf ein BN-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (Abbildung 5.10).

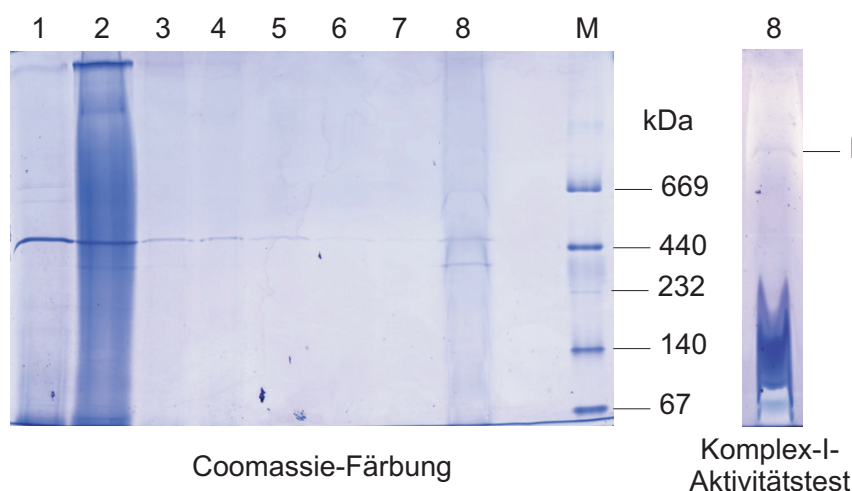


Abbildung 5.10: Fraktionen 1–8 des per Zentrifugation generierten und mit einem Organellengemisch aus *C. reinhardtii* beladenen, linearen Percoll®-Dichtegradienten (siehe Abbildung 5.9). Jeweils 20 µL der solubilisierten Fraktionen werden per Mini-BN-PAGE analysiert. Neben dem mit Coomassie gefärbten Gel (Spur (M) enthält den Proteinstandard HMW) ist auch eine auf Komplex-I-Aktivität hin untersuchte Gelspur (Fraktion 8) gezeigt.

Im BN-Gel erkennt man lediglich für Fraktion 2 mehrere Proteinbanden im hochmolekularen Bereich, insgesamt ist die Gelspur jedoch sehr verschmiert. In den Fraktionen 1 und 3–7 zeigt die Coomassie-Färbung keine Proteinkomplexe im oberen Bereich des Trenngels. Fraktion 8, bei der es sich um die Fraktion am Boden des Zentrifugenröhrchens handelt, beinhaltet zwar Proteinkomplexe, jedoch in sehr geringer Konzentration. Die Coomassie-Färbung dieser Banden im Gel ist sehr schwach. Alle isolierten Fraktionen werden auch auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht, es kann aber nur für Fraktion 8 eine schwache Färbung ausgemacht werden, bei der es sich vermutlich um das Monomer von Komplex I handelt. Superkomplexe werden in keiner Fraktion festgestellt. Durch das Mischen eines Teils Gradientenpuffer (2x) mit einem Teil Percoll® (100 % (w/v)) entsteht eine Puffer/Percoll®-Mischung (50 % (w/v) Percoll®), die zur Generierung des Gradienten zentrifugiert wird. Im Unterschied zum Gradienten aus Abbildung 5.7 ist hier die grüne Bande, die Chloroplasten enthalten sollte, sehr schmal (Abbildung 5.9). Da sich diese schmale Bande auch noch sehr weit oben im Gradienten, also bei niedriger Percoll®-Konzentration, befindet, weist diese Tatsache auf einen sehr großen Anteil an beschädigten Chloroplasten hin. Ein weiteres Indiz dafür ist die nahe des Röhrchenbodens befindliche weiße Schicht (Fraktion 7). Da auch diese Fraktion, wie das in Abbildung 5.10 dargestellte Mini-BN-Gel zeigt, keine Proteine enthält, könnte es sich hierbei um Stärke handeln, die aus den beschädigten Chloroplasten abgetrennt worden ist. Die schlechten Ergebnisse bezüglich der Trennung von Chloroplasten und Mitochondrien mittels kontinuierlicher Percoll®-Dichtegradienten führen dazu, die Methode zur Organellentrennung zu variieren. Nach einer Vorschrift von Funes *et al.* (2007)^[52] werden durch Kombination aus osmotisch induziertem Organellenaufschluss und Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation Mitochondrien

aus einem *C. reinhardtii*-Organellengemisch thylakoidfrei isoliert. Entsprechend der Durchführung in Abschnitt 4.4.2.2.1 wird nach Zentrifugation des Gemisches ($2000 \times g$, 5 min, 4°C) der Mitochondrien und weniger Chloroplasten enthaltende Überstand mit Hilfe eines Teflon-Glas-Homogenisators homogenisiert (500 U min^{-1} , 5 Hube). Nach dieser Behandlung entfernt man per Zentrifugation ($1500 \times g$, 5 min) unbeschädigte Chloroplasten und sedimentiert anschließend die im Überstand befindliche mitochondriale Rohfraktion. Nach erneuter Behandlung mit einem Teflon-Glas-Homogenisator, Percoll®-Dichtegradientenzentrifugation und anschließender Percoll®-Entfernung, erhält man etwa 250 μL einer aufgereinigten Mitochondriensuspension. Zur gelelektrophoretischen Analyse dieser Suspension werden die Mitochondrien mit 1 bzw. 1,5 % (w/v) Digitonin solubilisiert und vergleichend mit dem solubilisierten Organellengemisch per Mini-BN-PAGE getrennt. Neben Coomassie-Färbung und Komplex-I-Aktivitätstest wird auch per Western-Blot die Reinheit der mitochondrialen Fraktion untersucht.

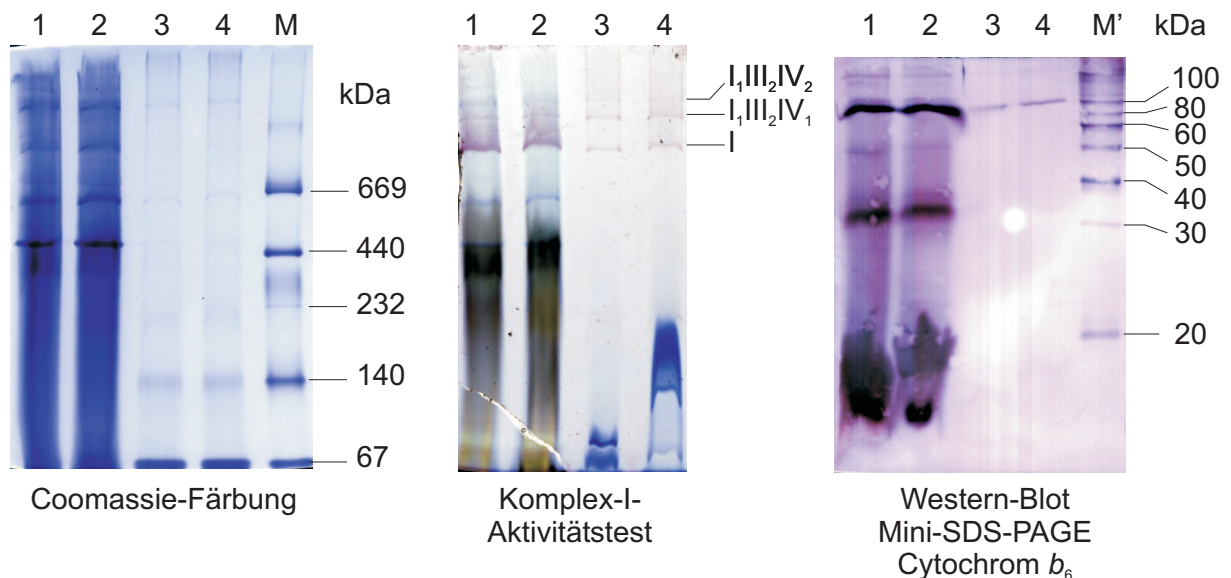


Abbildung 5.11: Mini-BN-Gel und Western-Blot eines Mini-SDS-Gels mit gereinigten Mitochondrien aus *C. reinhardtii*. Der Teil des BN-Gels, der mit Coomassie gefärbt wird (links), enthält den Proteinstandard HMW (M). Der andere Teil des Gels wird auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht (Mitte). Die Spuren 1 und 2 enthalten jeweils 20 μL eines mit 1 bzw. 1,5 % (w/v) Digitonin solubilisierten Organellengemisches aus *C. reinhardtii*, Spuren 3 und 4 die unter gleichen Bedingungen solubilierte, gereinigte Mitochondrienfraktion. Rechts ist der Western-Blot eines mit entsprechenden Proben beladenen Mini-SDS-Gels (Spur (M') enthält den Proteinstandard MagicMark™) gezeigt, der mit Antikörpern gegen die Untereinheit Cytochrom b_6 aus Chloroplasten markiert worden ist. Die Detektion der Antikörper erfolgt über das System der alkalischen Phosphatase (AP).

Bei Betrachtung der Gele erkennt man einen großen Unterschied zwischen dem solubilisierten Organellengemisch (Spuren (1) und (2)) und der mittels Dichtegradientenzentrifugation aufgereinigten Mitochondrienfraktion. Die Solubilisierung der in den Spuren (1) und (3) aufgetragenen Proben erfolgt mit 1 % (w/v), in den Spuren (2) und (4) mit 1,5 % (w/v) Digitonin. Der Aktivitätstest zeigt ebenfalls die erfolgreiche Abtrennung der Mitochondrien aus der gemischten Probe. Komplex-I-Monomer ist klar zu erkennen, sowie zwei Superkomplexbanden, die Komplex I enthalten. Der Western-Blot eines Mini-SDS-Gels, das mit den Solubilisaten

der Organellenmischung und der gereinigten Mitochondrienfraktion beladen worden ist, zeigt ebenfalls die gelungene Isolierung der Mitochondrien. Die Blotmembran wird mit primären Antikörper gegen Cytochrom b_6 aus Chloroplasten inkubiert und die immunologisch markierten Proteine mit AP detektiert. Im Vergleich zum Gemisch, das noch Chloroplasten enthält, wird für die Mitochondrienprobe nur noch eine schwache, auf Chloroplastenproteine zurückzuführende Bande festgestellt. Mit der erfolgreichen Abtrennung der Mitochondrien aus dem Organellengemisch aus *C. reinhardtii* geht allerdings auch ein erheblicher Verlust an Protein einher. Vergleicht man im Coomassie gefärbten Gel die Spuren (1) und (2) mit den Spuren (3) und (4), so fällt neben dem Reinigungseffekt auf, dass die Proteinbanden der Mitochondrien sehr viel schwächer erscheinen, als das bei der Organellenmischung der Fall ist. Der Teil des BN-Gels, der auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht wird, zeigt diesen Sachverhalt auch. Es können zwar das Komplex-I-Monomer sowie Komplex-I-enthaltende Superkomplexe nachgewiesen werden, im Vergleich zur nicht gereinigten Probe zeichnen sich diese Banden jedoch viel schwächer ab. Neben Percoll[®] als Dichtegradientenmedium wird zur Auftrennung von Organellengemischen auch Optiprep[™] eingesetzt. Hierbei handelt es sich ebenfalls um eine Lösung geringer Osmolarität, die als 60 %ige, sterile Lösung an Iodixanol in Wasser käuflich zu erwerben ist. Es werden zwei unterschiedliche kontinuierliche Gradienten zu Organellenreinigungszwecken eingesetzt. Im Unterschied zu Percoll[®] als Gradientenmedium kann hier der Gradient nicht per Zentrifugation generiert werden.

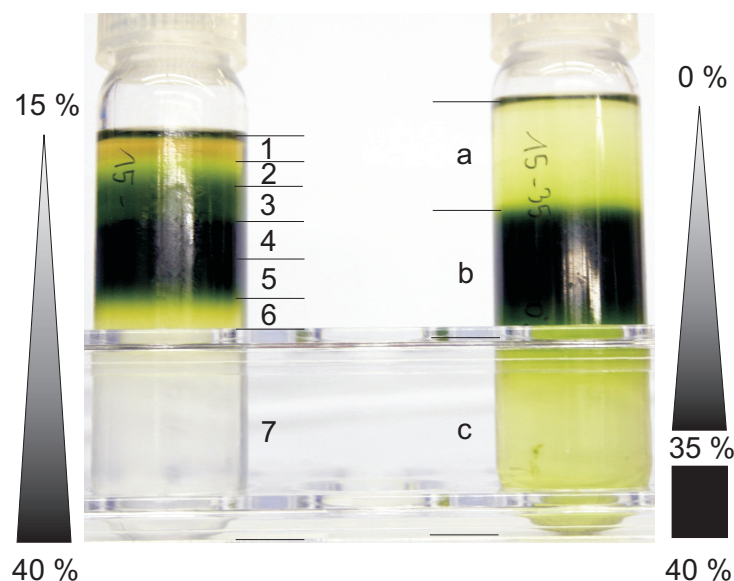


Abbildung 5.12: Optiprep[™]-Dichtegradienten nach der Zentrifugation mit jeweils 2 mL eines Organellengemisches aus *C. reinhardtii*. Es werden zwei verschiedene kontinuierliche Gradienten eingesetzt. Links ist ein kontinuierlicher Gradient von 15 bis 40 % (w/v) Iodixanol gezeigt, auf den die Probe oben aufgetragen worden ist. Rechts ist ein Röhrcchen gezeigt, das eine mit Probe vermischte 40 % Stufe am Boden besitzt, auf die ein kontinuierlicher Gradient von 15 bis 35 % (w/v) Iodixanol gegossen worden ist. Insgesamt werden 7 (links) bzw. 3 (rechts) Fraktionen gesammelt.

Entsprechend der Beschreibung in Abschnitt 4.4.3 erfolgt die Auftrennung zum einen mit Hilfe eines Gradienten von 15 bis 40 % an Iodixanol, auf den die Probe aufgetragen wird. Zum

anderen legt man die aufzureinigende Probe in einer 40 % Stufe an Iodixanol vor, auf die ein Gradient von 15 bis 35 % Optiprep[™] gegossen wird. Pro Zentrifugenröhrchen werden 2 mL einer Mischung aus *C. reinhardtii*-Organellen eingesetzt. Die Zentrifugation der Dichtegradienten erfolgt bei $26000 \times g$ und 4°C für 3 h. Beim Aufnehmen des relativ großen Pellets der Organellenmischung in der 40 % Stufe scheint diese verdünnt worden zu sein, sodass die Probe in den anschließend auf die Stufe gegossenen kontinuierlichen Gradienten hinein geschwommen ist und es hierbei zu einer ungewollten Durchmischung des Gradienten kam. Aus diesem Grund können lediglich drei Fraktionen (a–c) aus diesem Gradienten getrennt werden (rechtes SS-34-Röhrchen in Abbildung 5.12). Aus dem anderen Gradienten, der normal gegossen wurde und der mit der Probe durch Auftragen von oben beladen wurde, können insgesamt 7 Fraktionen isoliert werden. Für weitere Untersuchungen werden Fraktionen mit einer Chlorophyllkonzentration $\geq 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ verwendet. Diese Bedingung erfüllen die Fraktionen 3, 4 und 5 des regulären Dichtegradienten (links in Abbildung 5.12), sowie Fraktion b des in Abbildung 5.12 rechts gezeigten Zentrifugenröhrchens. Um den eventuellen Einfluss des Iodixanols auf die Solubilisierung der Proben zu untersuchen, werden die besagten Fraktionen (3,4,5 und b) zunächst ohne Iodixanol-Entfernung solubilisiert und gelelektrophoretisch getrennt. Zur Solubilisierung werden pro Fraktion 100 μL Ansätze pipettiert. Die Detergentskonzentration liegt bei 1 % (w/v) Digitonin und es wird Solubilisierungspuffer-O (2x) mit MnCl_2 verwendet.

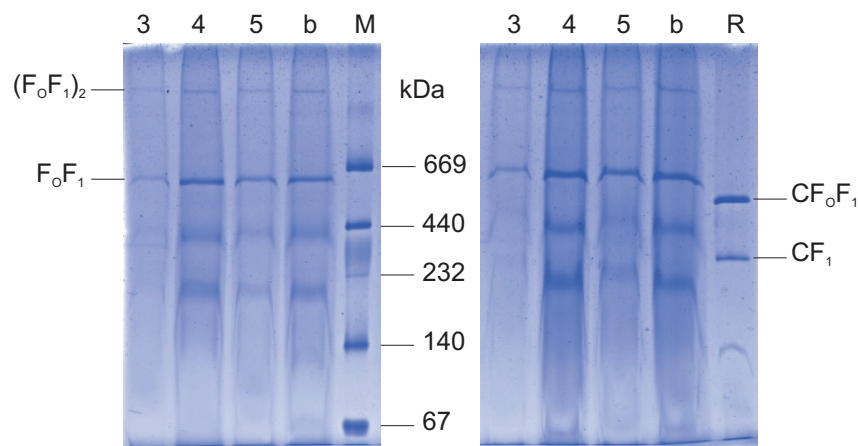


Abbildung 5.13: Mini-BN-Gel mit Fraktionen 3, 4, 5 und b aus der Optiprep[™]-Dichtegradientenzentrifugation. Die Proben werden ohne Entfernung von Iodixanol mit 1 % (w/v) Digitonin solubilisiert. Der linke Teil des Gels ist mit jeweils 20 μL Probe beladen worden, der rechte mit jeweils 30 μL . Neben dem HMW-Marker (Gelteil links, Spur (M)) sind rechts in eine Referenzspur (R) 5 μg gereinigte ATP-Synthase aus Spinachchloroplasten aufgetragen worden (5 μL aus 1 mg mL^{-1}).

Jeweils 20 bzw. 30 μL der solubilisierten Fraktionen 3, 4, 5 und b werden auf ein Mini-BN-Gel aufgetragen und per BN-Gelelektrophorese analysiert. Neben dem HMW-Proteinstandard als Marker wird das BN-Gel zusätzlich mit 5 μg gereinigter ATP-Synthase aus Spinat beladen (5 μL aus 1 mg mL^{-1}). Der hohe Anteil an CF_1 ist auf die längere Lagerung der Referenz bei 4°C zurückzuführen. Abbildung 5.13 zeigt das mit Coomassie gefärbte Gel nach der BN-Elektrophorese. Deutlich zu erkennen sind das Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase sowie das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase. Das Komplex-I-Monomer, sowie Komplex-I-

enthaltende Superkomplexe können dagegen mit Coomassie nur sehr schwach angefärbt werden. Das bei der Solubilisierung noch vorhandene Iodixanol hat einen verdünnenden Einfluss. Die beiden Formen der ATP-Synthase liegen offensichtlich im Solubilisat in deutlich höheren Konzentrationen vor als das für andere hochmolekulare Proteinkomplexe der Fall ist. Zwischen den einzelnen Fraktionen sind nur geringfügige Intensitätsunterschiede festzustellen. Bezogen auf das ATP-Synthase-Monomer und -Dimer sind die höchsten Bandenintensitäten in den Fraktionen 4 und b auszumachen. Dieses Ergebnis ist nicht verwunderlich, da diese Fraktionen ähnlich weit im Dichtegradienten gewandert sind und beide einen relativ hohen Chlorophyllanteil aufweisen ($0,27 \text{ mg mL}^{-1}$ in Fraktion 4 und b). Die Chlorophyllkonzentration von Fraktion 5 liegt zwar mit $0,29 \text{ mg mL}^{-1}$ etwas über den Werten der Fraktionen 4 und b, enthält aber bezogen auf die Bandenintensität im Mini-BN-Gel weniger Protein. Um genauere Aussagen bezüglich der Proteinverteilung der einzelnen Fraktionen machen zu können, wird das noch vorhandene Iodixanol aus den Proben entfernt und diese somit konzentriert. Jeweils $100 \mu\text{L}$ der Fraktionen werden mit $1,2 \text{ mL}$ Puffer-O (2x) mit 5% (w/v) Glycerin versetzt und 10 min bei $20000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die von Iodixanol befreiten Pellets resuspendiert man in $90 \mu\text{L}$ Puffer-O (2x) und setzt zur Solubilisierung 1% (w/v) Digitonin zu. Jeweils $20 \mu\text{L}$ der solubilisierten Fraktionen werden auf Mini-BN-Gele aufgetragen und nach der Elektrophorese auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht, sowie mit Coomassie gefärbt (Abbildung 5.14).

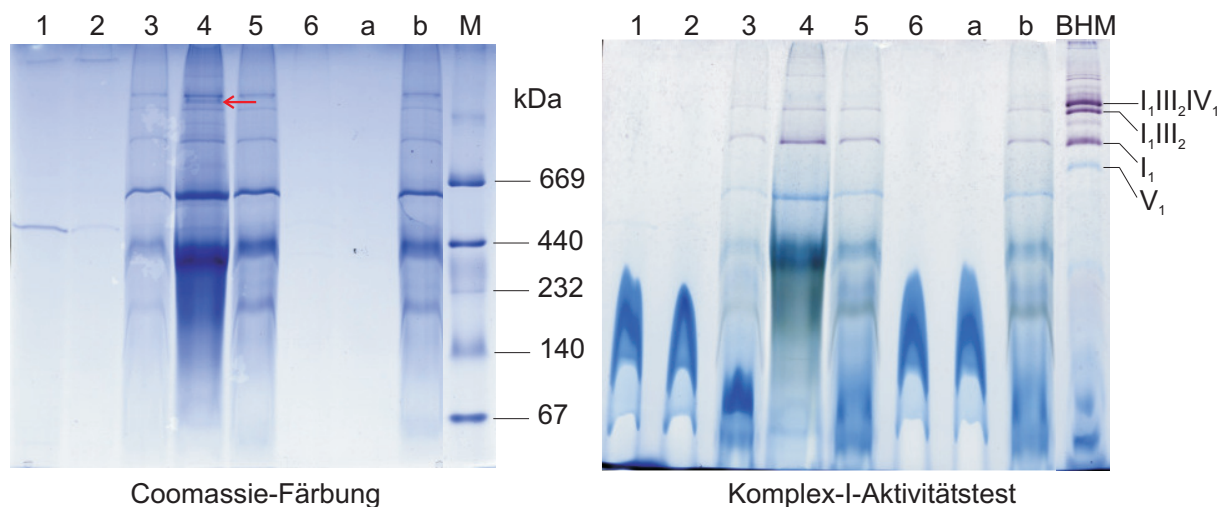


Abbildung 5.14: Mini-BN-Gele mit den Fraktionen 1, 2, 3, 4, 5, 6, a und b aus der Optiprep™-Dichtegradientenzentrifugation. Die Proben werden nach Entfernung von Iodixanol mit 1% (w/v) Digitonin solubilisiert. Das mit Coomassie gefärbte Gel (links) enthält in Spur (M) den Proteinstandard HMW. Das in Komplex-I-Aktivitätstestpuffer inkubierte Mini-BN-Gel (rechts) wird neben den solubilisierten Proben zusätzlich mit solubilierten Mitochondrien aus Rinderherz beladen ($5 \mu\text{L}$ BHM, 2 mg mL^{-1}). Der rote Pfeil im Coomassie gefärbten Gel deutet auf eine nur in Fraktion 4 auftauchende Proteinbande hin, bei der es sich um $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$ handeln könnte.

Durch das Entfernen von Iodixanol kommt es zu einer Konzentrierung der per Dichtegradient fraktionierten Proben. Deutlich ist dies daran zu erkennen, dass im Gegensatz zum Mini-BN-Gel in Abbildung 5.13, neben dem ATP-Synthase-Monomer und -Dimer nun auch Komplex-I-Monomer, sowie Komplex-I-enthaltende Superkomplexe gefärbt werden. Das Mini-BN-Gel aus

Abbildung 5.13 ist nur mit Fraktionen beladen worden, die auf Grund ihrer auf Chlorophyll zurückzuführenden Färbung Proteine vermuten lassen. Das Mini-BN-Gel aus Abbildung 5.14 bestätigt diese Vermutung. Hier zeigt sich, dass die Fraktionen 1, 2, 6 und a keine bzw. keine interessierenden Proteine enthalten (z. B. RuBisCO in Fraktion 1 und 2). Die sichtbare Erhöhung der Proteinbandenintensitäten im Mini-BN-Gel nach Iodixanol-Entfernung zeigt sich auch quantitativ in einer Erhöhung der Chlorophyllkonzentrationen der Fraktionen 3, 4, 5 und b. Bei Anwesenheit von Iodixanol werden Chlorophyllkonzentrationen zwischen 0,2 und 0,29 mg mL⁻¹ erhalten. Nach Entfernung des Dichtegradientenmediums und Konzentrierung der Proben liegen die Werte zwischen 0,3 und 1,02 mg mL⁻¹ Chlorophyll, was im Falle von Fraktion 4 fast einer Vervierfachung des Gehaltes an Chlorophyll entspricht. In Abbildung 5.15 sind die Absorptionsspektren der gelösten Chlorophylle der Fraktionen 3, 4, 5 und b vor und nach der Iodixanol-Entfernung in einem Wellenlängenbereich von $\lambda = 350 - 750$ nm gezeigt. Gut erkennbar sind die charakteristischen Banden für Chlorophyll *a* und *b* (Q_y -Banden zwischen 600 und 700 nm, Soret-Banden zwischen 400 und 500 nm).

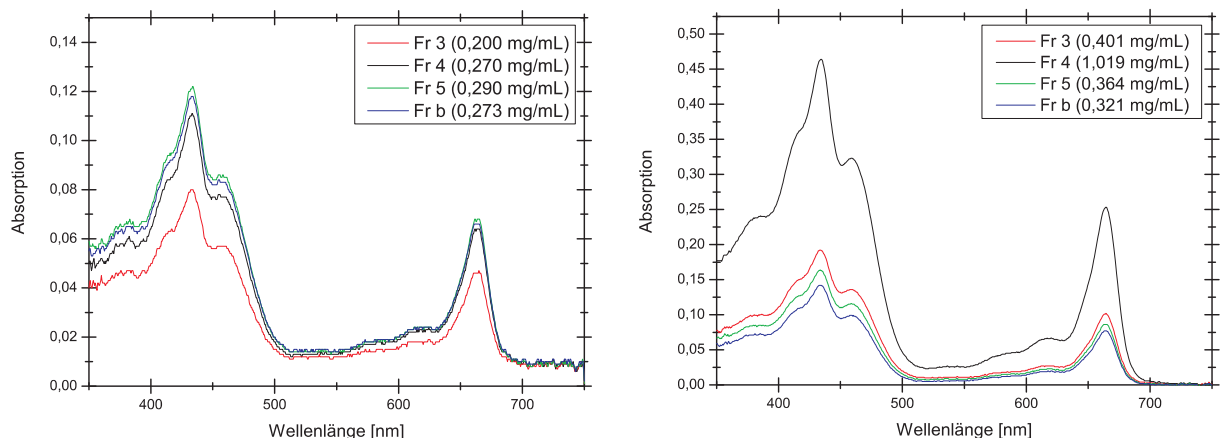


Abbildung 5.15: Absorptionsspektren gelöster Chlorophylle der Fraktionen 3, 4, 5 und b der Optiprep™-Dichtegradientenzentrifugation vor (links) und nach (rechts) der Iodixanol-Entfernung. Durch die Konzentrierung der Proben nach der Entfernung des Dichtegradientenmediums steigt auch deren Chlorophyllkonzentration (beachte Ordinatenwerte).

Die Ergebnisse der Optiprep™-Dichtegradientenzentrifugation zeigen, dass auch hier keine zufriedenstellende Trennung zwischen Chloroplasten und Mitochondrien erreicht werden konnte. Die Tatsache, dass in allen Protein-enthaltenden Fraktionen, die durch Chlorophyll stark grün gefärbt sind, Komplex I nachgewiesen werden kann, deutet weiterhin, wie im Gemisch, auf einen hohen Anteil an Mitochondrien hin. Der einzige Hinweis, der auf einen höheren Chloroplasten-Anteil in Fraktion 4 deutet, ist neben der intensiven grünen Farbe das Vorhandensein einer zusätzlichen Proteinbande im Mini-BN-Gel. Zwischen dem Komplex-I-enthaltenden Superkomplex und dem Dimer der ATP-Synthase ist eine weitere Bande erkennbar, die in allen anderen Fraktionen mit ATP-Synthase-Dimerbande fehlt (roter Pfeil in Abbildung 5.14). Um festzustellen, ob es sich bei dieser Proteinbande eventuell um das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase handelt, werden die per Mini-BN-PAGE getrennten Proben geblottet und der Western-Blot mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit der ATP-Synthase aus Spinatchloroplasten-

ten markiert. Die Detektion der immunologisch markierten Proteine erfolgt mittels AP (Abbildung 5.16). In den jeweiligen Fraktionen kann auf diese Weise jedoch nur das Monomer der ATP-Synthase nachgewiesen werden, sodass die Frage, ob es sich bei dieser zusätzlichen Bande um $(CF_0F_1)_2$ handelt, weiterhin unbeantwortet bleibt.

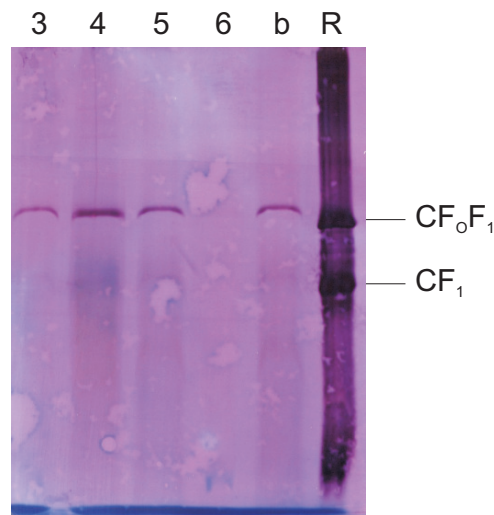


Abbildung 5.16: Western-Blot der Fraktionen 3, 4, 5, 6 und b aus der Optiprep[™]-Dichtegradientenzentrifugation. Die immunologische Markierung der Proteine erfolgt mit Antikörpern gegen die α -UE der ATP-Synthase aus Spinatchloroplasten und die Detektion per alkalischer Phosphatase (AP). Die letzte Spur enthält 3 μ g gereinigte ATP-Synthase aus Spinatchloroplasten (R).

Wie die Ergebnisse in diesem Abschnitt zeigen, ist es nicht gelungen eine zufriedenstellende Trennung von Chloroplasten und Mitochondrien aus einem Organellengemisch der Grünalge *C. reinhardtii* zu erreichen. Sowohl der Einsatz verschiedener Arten der Dichtegradientenzentrifugation, als auch die Verwendung verschiedener Dichtegradientenmedien führen nicht zur gewünschten Trennung. Eine mögliche, bereits angesprochene Begründung für die erfolglose Organellentrennung beruht darauf, dass der mechanische Aufschluss der Algenzellen mit Glas-kugeln zu einer nicht unerheblichen Beschädigung von Chloroplasten führt. Die Größenunterschiede zwischen Chloroplasten und Mitochondrien, die die Grundlage für eine Trennung in einem nicht isopyknischen Dichtegradienten (Zonalzentrifugation) darstellen, sind durch diese Beschädigung nicht mehr gegeben. Unterschiedlich große Chloroplastenfragmente migrieren im Dichtegradienten somit als relativ breites, grünes Band, welches eventuell intakte Mitochondrien mit beinhaltet und eine Trennung deutlich erschwert. Aufgrund des Mangels an alternativen Aufschlussmöglichkeiten der Zellen erfolgen zukünftige Probenaufreinigungen nicht mehr auf Basis der Trennung von Zellorganellen, sondern hinsichtlich der jeweils enthaltenen Proteine. Zum einen sei hierzu die Elution von Proteinkomplexen aus nativen Gelen, zum anderen die Separierung von solubilisierten Proteinkomplexen per Dichtegradientenzentrifugation genannt. Die Ergebnisse der zuletzt genannten Methode werden in Kapitel 5.3.2 diskutiert.

5.3.2 Aufreinigung von Proteingemischen

5.3.2.1 *C. reinhardtii*

Zur Aufreinigung von solubilisierten Proteingemischen per Dichtegradientenzentrifugation werden lineare Gradienten aus Saccharose eingesetzt. Im Gegensatz zur Trennung von Organellen ist es bei der Proteintrennung nicht mehr erforderlich, auf osmotische Effekte zu achten. Im Gegenteil, hohe Konzentration des Zuckers (lineare Gradienten von 15 bis 55 % (w/v) Saccharose), neben geringen Konzentrationen an Detergens, haben einen stabilisierenden Effekt auf Proteine und Proteinkomplexe, sodass sich dieses Medium für Dichtegradientenzentrifugationen von Proteingemischen eignet. Eine Chloroplastensuspension aus photomixotroph angezogenen *C. reinhardtii* Zellen mit einer Chlorophyllkonzentration von $2,3 \text{ mg mL}^{-1}$ wird mit Digitonin (1,5 % (w/v)) solubilisiert. Als Solubilisierungspuffer wird hier Puffer-O (2x) mit 5 % (w/v) Glycerin verwendet. Die genauen Zusammensetzungen der verwendeten Lösungen und Puffer sind Abschnitt 4.4.1 zu entnehmen. 1 mL des erhaltenen Solubilisates ($0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ Chlorophyllkonzentration) wird auf einen linearen Gradienten von etwa 10 bis 50 % (w/v) Saccharose aufgetragen und 18 h bei $175600 \times g$ im SW-41-Rotor zentrifugiert (entspricht einem linearen Gradienten von $0,3$ bis $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ Saccharose und einer Zentrifugation für 20 h bei $150000 \times g$ ^[49]).

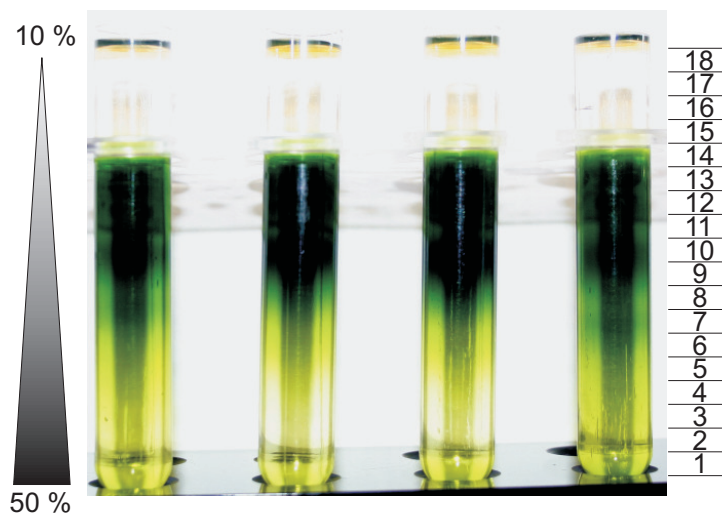


Abbildung 5.17: Lineare Dichtegradienten von 10 bis 50 % (w/v) Saccharose. Jeweils 1 mL solubilierte Chloroplasten-Proteine einer photomixotrophen Anzucht von *C. reinhardtii* werden oben auf Dichtegradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation (18 h, $175600 \times g$, 4°C) erfolgt die Fraktionierung der Proben vom Boden der Röhrchen über eine an eine Kanüle angeschlossene Peristaltikpumpe ($0,65 \text{ mL min}^{-1}$, Fraktionswechsel jeweils nach 1 min). Insgesamt werden 18 Fraktionen erhalten.

Die in Abbildung 5.17 dargestellten Röhrchen zeigen das Ergebnis der Dichtegradientenzentrifugation. Die anschließende Fraktionierung der Proben erfolgt über eine an eine Peristaltikpumpe angeschlossene Kanüle, die die Lösung vom Boden des Zentrifugenröhrchens entnimmt ($0,65 \text{ mL min}^{-1}$, Fraktionswechsel jeweils nach 1 min). Gleiche Fraktionen aus mehreren Röhrchen werden vereint und insgesamt 18 Fraktionen gesammelt. Die Fraktionen 1–6 haben eine

relativ homogene, hellgrüne Farbe. Darüber schließt sich ein grünlicher Bereich an, der mehrere schwer zu erkennende Banden enthält (Fraktionen 7 und 10). Der obere Teil der Gradientenlösung ist farblos (Fraktionen 15–18). Auf Grund der Tatsache, dass Teile der Probe bis zum Boden des Röhrchens sedimentieren bzw. die Probe relativ weit zu Beginn des Gradienten ohne nennenswerte Auftrennung wandert, spricht für einen nicht optimalen Trennungsbereich bezüglich der Saccharosekonzentrationen. Deshalb werden für zukünftige Dichtegradientenzentrifugationen sowohl die minimale Saccharosekonzentration von 10 auf 15 % (w/v), als auch die maximale von 50 auf 55 % (w/v) erhöht. Dadurch ist zu erwarten, dass zum einen die Zentrifugation eventuell isopyknisch verläuft und zum anderen die Auftrennung der Probe gleich zu Beginn des Gradienten stattfindet. Folglich kann mit einer verbesserten Trennleistung gerechnet werden. Die weitere Analyse der erhaltenen Fraktionen erfolgt mittels BN-PAGE. Hierzu werden jeweils 80 µL der erhaltenen Fraktionen auf einem großen BN-Gel (18,0 × 16,0 cm², 20 Taschen) elektrophoretisch getrennt und anschließend Coomassie gefärbt. In Abbildung 5.18 ist das BN-Gel nach der Färbung gezeigt.

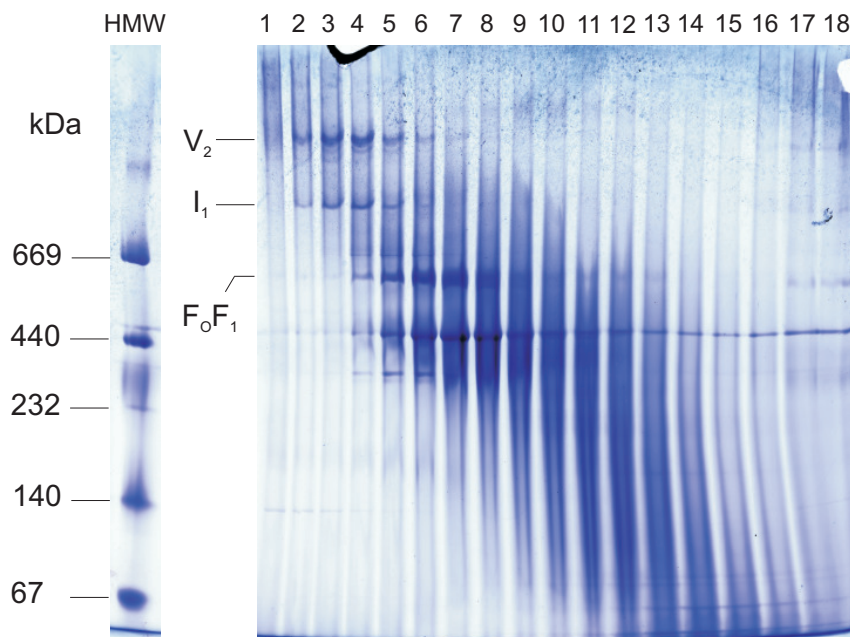


Abbildung 5.18: BN-Gel mit fraktionierten, solubilisierten Proteinen einer Chloroplastenprobe aus *C. reinhardtii*. Die Reinigung erfolgt über einen linearen Dichtegradienten von 10 bis 50 % (w/v) Saccharose (siehe Abbildung 5.17). Jeweils 80 µL der 18 erhaltenen Fraktionen werden aufgetragen und das BN-Gel nach der Elektrophorese Coomassie gefärbt.

Proteinkomplexe mit hohen Molekularmassen befinden sich in den ersten Fraktionen, Proteine mit niedrigen Massen in den letzten Fraktionen, da die Entnahme der einzelnen Fraktionen vom Boden aus durchgeführt wird. In den Fraktionen 2, 3, 4, 5 und 6 ist im oberen Teil des Gels eine intensiv gefärbte Bande festzustellen, die auf das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase zurückzuführen ist. In Fraktion 7 ist diese Bande nur noch zu erahnen. Des Weiteren ist deutlich das Monomer von Komplex I in den Fraktionen 2–6 zu erkennen. Die Bande des ATP-Synthase-Monomers zeichnet sich schwach in den Fraktionen 1–3 und deutlich von 4–8 ab. Zur weiteren Analyse werden die Proteine aus den BN-Gelstreifen (15-Taschen BN-Gel) der Fraktionen 3,

5 und 7 denaturierend in der zweiten Dimension aufgetrennt. Die abgetrennten Gelstreifen werden vor der 2D-SDS-PAGE mindestens 45 min in einer Lösung bestehend aus 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol und 1 % (w/v) SDS inkubiert. Für die zweite Geldimension werden hier Midi-Ahn-Gele ($10,0 \times 10,5 \text{ cm}^2$) verwendet, die ohne Sammelgel auskommen. Aus diesem Grund werden die Gelstreifen aus dem großen BN-Gel etwa halbiert und nur der obere Teil, also der Teil mit größeren Proteinkomplexen, per 2D-SDS-PAGE untersucht. Die Färbung der 2D-SDS-Gele erfolgt mit Coomassie (Mischung aus Coomassie G-250 und R-250, Tabelle 4.34).

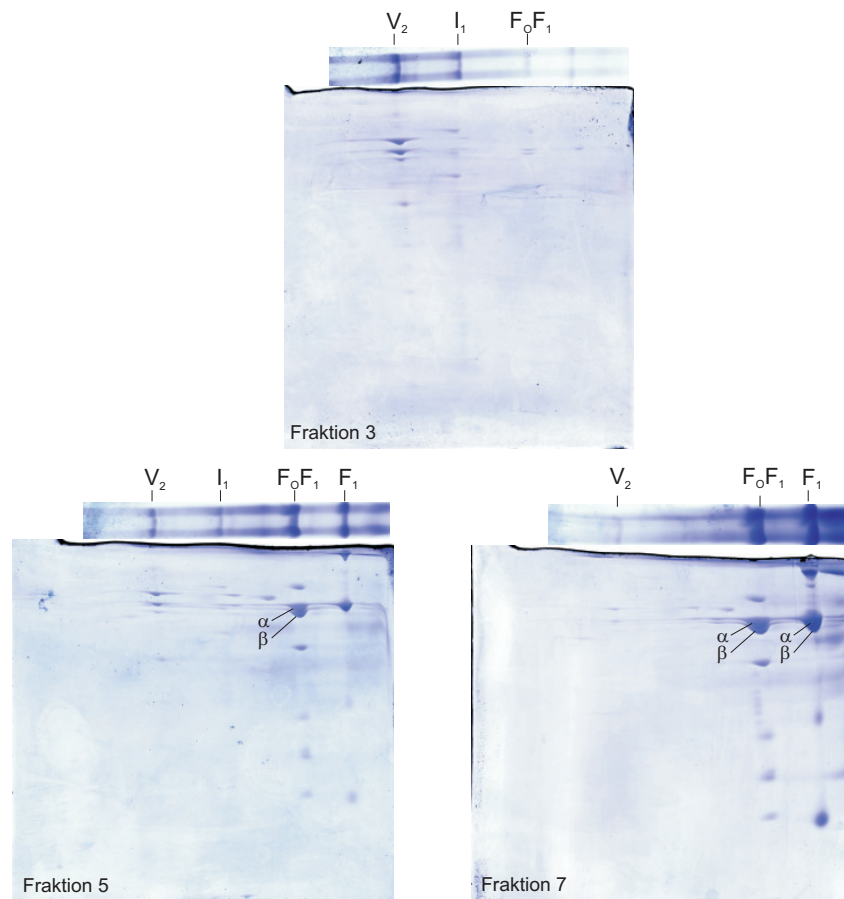


Abbildung 5.19: 2D-SDS-Ahn-Gele der mittels BN-PAGE aufgetrennten Fraktionen 3, 5 und 7 aus einem Saccharosedichtegradienten (Abbildung 5.18). Aufgrund des Midi-Formates der Ahn-Gele ($10,0 \times 10,5 \text{ cm}^2$) werden die BN-Gel-Streifen halbiert und der hochmolekulare Teil per 2D-SDS-PAGE aufgetrennt. In den Fraktionen 5 und 7 sind die jeweils intensiv gefärbten ATP-Synthase-Untereinheiten α und β angedeutet. Es erfolgt eine Coomassie-Färbung der 2D-Gele.

Mit der Analyse der BN-Gelstreifen in der zweiten denaturierenden Dimension kann unter anderem das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase (V_2) nachgewiesen werden. Für Fraktion 3 sind mehrere Untereinheiten des ATP-Synthase-Dimers auszumachen sowie sehr schwache Spots, die auf Untereinheiten von Komplex I zurückzuführen sind. Wie schon im BN-Gel beobachtet, ist die ATP-Synthase-Monomerbande in Fraktion 3 wenig intensiv ausgeprägt, sodass auch im 2D-SDS-Gel nur schwach gefärbte Spots der α - und β -UE zu entdecken sind. In Fraktion 5 nimmt die Bandenintensität sowohl des ATP-Synthase-Dimers, als auch von Komplex I ab, was mit weniger intensiven Spots der jeweiligen Proteinuntereinheiten im 2D-SDS-Gel einhergeht.

Einzelne Untereinheiten des F_0F_1 -Monomers dagegen sind für Fraktion 5 deutlich zu erkennen. Für Fraktion 7 setzt sich das für Fraktion 5 Gesagte fort. Untereinheiten des ATP-Synthase Dimers sind kaum noch festzustellen, Komplex I ist in dieser Fraktion nicht mehr enthalten, und der Gehalt an ATP-Synthase-Monomer ist in Fraktion 7 größer geworden. Die gefärbten Spots ober- und unterhalb der α - und β -UE von F_1 im 2D-SDS-Gel von Fraktion 7 könnten auf Untereinheiten von Proteinkomplexen des Photosyntheseapparates zurückzuführen sein (z. B. Photosystem I (PSI)), die im BN-Gel auf gleicher Höhe wie F_1 migrieren. Spots vermeintlicher Superkomplexbanden, die sich im BN-Gel als schwache Banden zwischen $(F_0F_1)_2$ und Komplex I abzeichnen, werden im 2D-SDS-Gel nicht gefärbt. Um festzustellen in welchen Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation überwiegend Proteine aus Photosystemen, sprich Chloroplasten, zu finden sind, werden die Proteine der Fraktionen 3–15 und 18 denaturierend per SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Blotmembranen inkubiert man anschließend mit Antikörperlösungen gegen Cytochrom b_6 und PsaC. Hierbei handelt es sich um in Chloroplasten enthaltene Protein-Untereinheiten der Photosynthesekomplexe Cytochrom b_6f sowie des Photosystems I (PSI). Die Detektion der primären Antikörper erfolgt hier über das HRP-System.

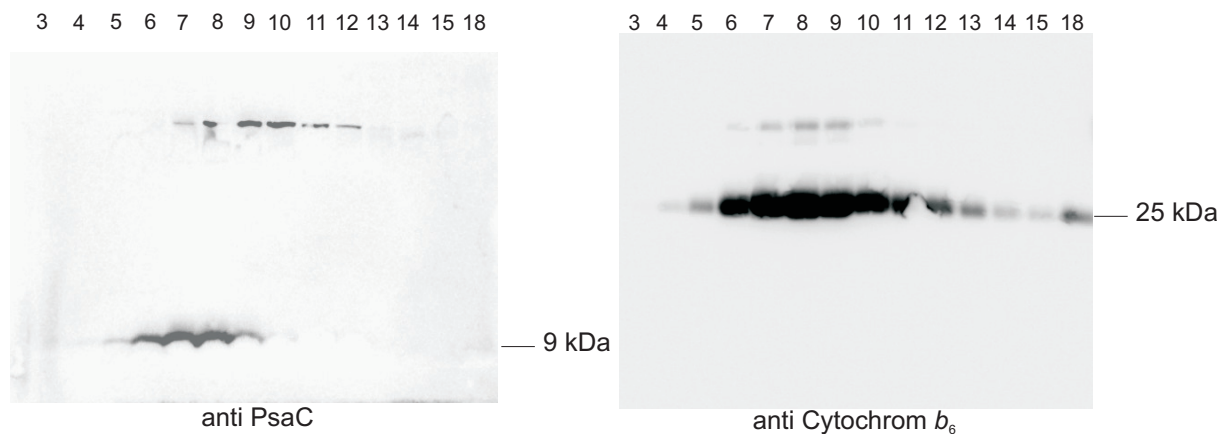


Abbildung 5.20: Western-Blots der per SDS-PAGE getrennten Fraktionen 3–15 und 18 der Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 5.17). Zum Nachweis von Proteinen aus der Photosynthese werden die Membranen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten PsaC aus PSI (links, apparente Masse 9 kDa) und Cytochrom b_6 des Cytochrom b_6f -Komplexes (rechts, apparente Masse 25 kDa) inkubiert. Die Detektion erfolgt über das Horseradish peroxidase-System (HRP).

Deutlich können Banden für die Untereinheiten PsaC und Cytochrom b_6 auf den Blotmembranen festgestellt werden. Die Bandenintensität für Cytochrom b_6 ist in den Fraktionen 4 und 5 noch relativ schwach, nimmt ab Fraktion 6 deutlich zu und sinkt ab Fraktion 12 wieder ab. Auffällig sind auch schwach gefärbte Banden in den Fraktionen 6–11 oberhalb der Cytochrom b_6 -Bande, bei denen es sich vermutlich um unspezifisch markierte Proteine handelt. Bezüglich der immunologischen Markierung der Proteinuntereinheit PsaC aus PSI ist ebenfalls eine zunächst schwache Färbung in den Fraktionen 4 und 5 zu erkennen, die für die Fraktionen 6–9 deutlich an Intensität zunimmt und in Fraktion 10 wieder sehr viel schwächer ausfällt. Im Unterschied zur Markierung von Cytochrom b_6 , können für PsaC nach Fraktion 10 keine weiteren

Färbungen dieser Untereinheit festgestellt werden. Allerdings sind in den Fraktionen 7–12 im oberen Bereich des Western-Blots Banden auszumachen, die deutlich intensiver gefärbt sind als die entsprechenden Banden der Cytochrom b_6 -Markierung. Es kann somit zusammenfassend gesagt werden, dass die beiden nachgewiesenen Proteine, bei denen es sich um typische in Chloroplasten vorkommende Proteine des Photosyntheseapparates handelt, hauptsächlich ab Fraktion 6 aus der Dichtegradientenzentrifugation enthalten sind. Die Tatsache, dass in den Fraktionen 3–6 keine mit Photosynthese-Antikörpern markierten Proteine nachgewiesen werden (bezogen auf Cytochrom b_6 und Psac), spricht für das Vorhandensein mitochondrialer Proteinkomplexe, wie beispielsweise Komplex I, in diesen Fraktionen. Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass hier ebenfalls noch Proteine des Photosystems II (PSII) enthalten sein können. Abgesehen von den in beiden Organellen vorhandenen ATP-Synthasen, CF_0F_1 und MF_0F_1 bzw. den entsprechenden dimeren Formen, stellt die Dichtegradientenzentrifugation mit Saccharose eine geeignete Methode zur Trennung von solubilisierten Proteinkomplexen aus unterschiedlichen Organellen der Grünalge *C. reinhardtii* dar. Im Folgenden werden die Ergebnisse einer Dichtegradientenzentrifugation gezeigt, bei der, wie schon oben erwähnt, die Saccharosekonzentration auf 15 % (w/v) zu Beginn und 55 % (w/v) Saccharose als höchste Dichte des Gradienten erhöht wird. Außerdem erfolgt die Entnahme der Fraktionen nicht per Peristaltikpumpe, sondern per Augenmaß mit Hilfe einer gewinkelten Pasteur-Glaspipette. Dies hat den Vorteil, dass offensichtliche Banden im Gradienten genauer entnommen werden können als das per Pumpe der Fall ist. Farblose Bereiche innerhalb des Gradienten, die keine sichtbaren Banden enthalten, werden zu jeweils 1 mL portioniert.

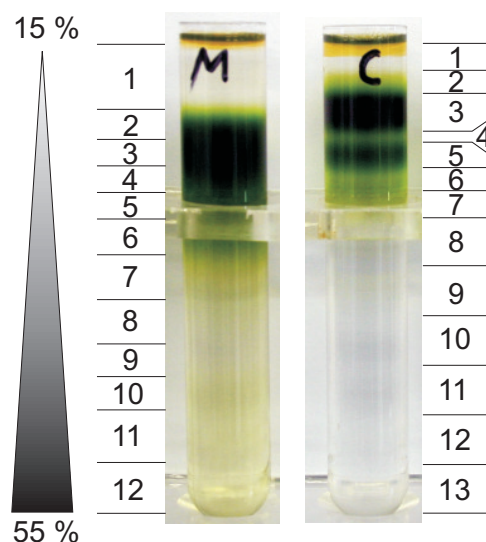


Abbildung 5.21: Lineare Dichtegradienten von 15 bis 55 % (w/v) Saccharose. Jeweils 1 mL solubilisierter Chloroplasten (rechts, $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, 25 g DDM g^{-1} Chlorophyll) bzw. Mitochondrien (links, $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, $30 \text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll) einer photomixotrophen Anzucht von *C. reinhardtii* werden oben auf den Dichtegradienten aufgetragen. Nach der Zentrifugation (16 h, $187500 \times g$, 4°C) erfolgt die Fraktionierung der Proben von oben nach unten im Röhrchen mit einer gewinkelten Pasteur-Glaspipette. Klar ersichtliche Banden werden separiert, farblose Bereiche zu jeweils 1 mL portioniert. Insgesamt werden für die Mitochondrien 12, für die Chloroplasten 13 Fraktionen erhalten.

Abbildung 5.21 zeigt das Ergebnis einer Dichtegradientenzentrifugation solubilisierter Chloroplasten bzw. Mitochondrien aus *C. reinhardtii*. Der Solubilisierungsansatz der Mitochondrien wird auf eine Chlorophyllkonzentration von $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ verdünnt und die Solubilisierung mit einem Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnis von 30 g g^{-1} durchgeführt. Für die Chloroplasten wird hier, bei gleicher Chlorophyllkonzentration, das im Vergleich zu Digitonin stärkere Detergens DDM eingesetzt (25 g DDM g^{-1} Chlorophyll). Dieser Unterschied ist direkt nach der Zentrifugation anhand des unterschiedlichen Bandenmusters erkennbar. Das sanfte Detergens Digitonin ist in der Lage, große Protein(supr)komplexe zu solubilisieren, sodass hier eine leicht grünliche Färbung, sowie eine schwache Bande (Fraktion 10, Mitochondrien, linkes Röhrchen in Abbildung 5.21), im Bereich höherer Dichten des Gradientenmediums auszumachen ist. Im Unterschied dazu ist für die Chloroplastenprobe nach Fraktion 7 keine grüne Färbung des Gradientenmediums mehr erkennbar, was natürlich nicht heißt, dass sich hier keine Proteine mehr befinden. Auch sind im stark grünen Abschnitt, mit niedriger Mediumsdichte, im Unterschied zur Mitochondrienprobe mehrere Banden zu sehen. Die Solubilisierung mit DDM führt also dazu, dass etwaige Proteinkomplexe der Photosynthese zum Teil in Subkomplexe aufgespalten werden, deren geringere Massen nicht weit in den Dichtegradienten migrieren. Zur Analyse der jeweiligen Fraktionen werden diese gelelektrophoretisch auf Mini-BN-Gelen aufgetrennt. In Abbildung 5.22 ist das Ergebnis der Gelelektrophorese der Chloroplastenfraktionen zu sehen. Ein Gel wird mit Coomassie gefärbt, das andere in Komplex-I-Aktivitätstestlösung inkubiert. Das Fehlen der NADH-Dehydrogenase in Chloroplasten sollte theoretisch dazu führen, dass ein mit Chloroplastenfraktionen beladenes BN-Gel nach Inkubation in Komplex-I-Aktivitätstestlösung keine auf den Test zurückzuführende Bandenfärbung aufweist.

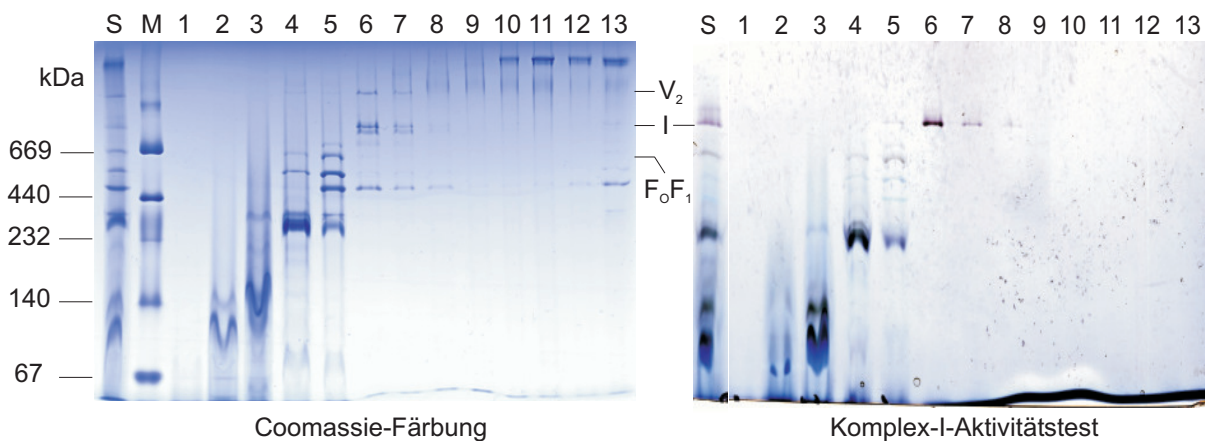


Abbildung 5.22: BN-Gele der per Saccharosedichtegradientenzentrifugation (15–55 % (w/v)) aufgetrennten Chloroplastenfraktionen (Abbildung 5.21 rechts). Zusätzlich zu den jeweiligen Fraktionen ist das nicht aufgereinigte Solubilisat (S) aufgetragen. Die Gele werden mit $16 \mu\text{L}$ der entsprechenden unverdünnten Fraktionen, sowie mit $4 \mu\text{L}$ des Solubilisates beladen. Ein BN-Gel wird mit Coomassie gefärbt (links), das andere in Komplex-I-Aktivitätstestlösung inkubiert (rechts). Das Coomassie gefärbte Gel enthält in Spur (M) den Proteinstandard HMW.

Die positive Reaktion für Komplex I im BN-Gel der Chloroplastenfraktionen kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass präparationsbedingt keine 100 %ige Trennung von Chloroplasten und Mitochondrien erreicht wird. Zum anderen ist nicht auszuschließen, dass eine in *C.*

reinhardtii-Chloroplasten möglicherweise vorhandene alternative NADH-Dehydrogenase zu einem positiven Ergebnis des *In-Gel*-Enzymtests führen kann. Bei Betrachtung des mit Coomassie gefärbten BN-Gels fällt auf, dass oberhalb 669 kDa relativ wenige Proteinbanden auszumachen sind. Die mit DDM durchgeführte Solubilisierung der Thylakoide hat zur Folge, dass Superkomplexe in ihre jeweiligen Subkomplexe gespalten werden und auf Grund ihrer geringeren Masse weiter nach unten im BN-Gel migrieren. Der Aktivitätstest für Komplex I rechts in Abbildung 5.22 zeigt in Fraktion 6 eine intensiv, in Fraktion 5 und 7 eine schwach gefärbte Bande, bei der es sich jeweils um das Monomer der NADH-Dehydrogenase handelt. Aus den angesprochenen Gründen können hier keine Komplex-I-enthaltenden Superkomplexbanden nachgewiesen werden. Das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase bleibt im Gegensatz zu mitochondrialen Superkomplexen auch nach Solubilisierung mit DDM stabil. In den Fraktionen 6 und 7 können die entsprechenden Banden im Coomassie gefärbten BN-Gel identifiziert werden. In Abbildung 5.23 ist das Ergebnis der Gelelektrophorese der Mitochondrienfraktionen gezeigt. Ein Gel wird mit Coomassie gefärbt, das andere mit Komplex-I-Aktivitätstestlösung inkubiert.

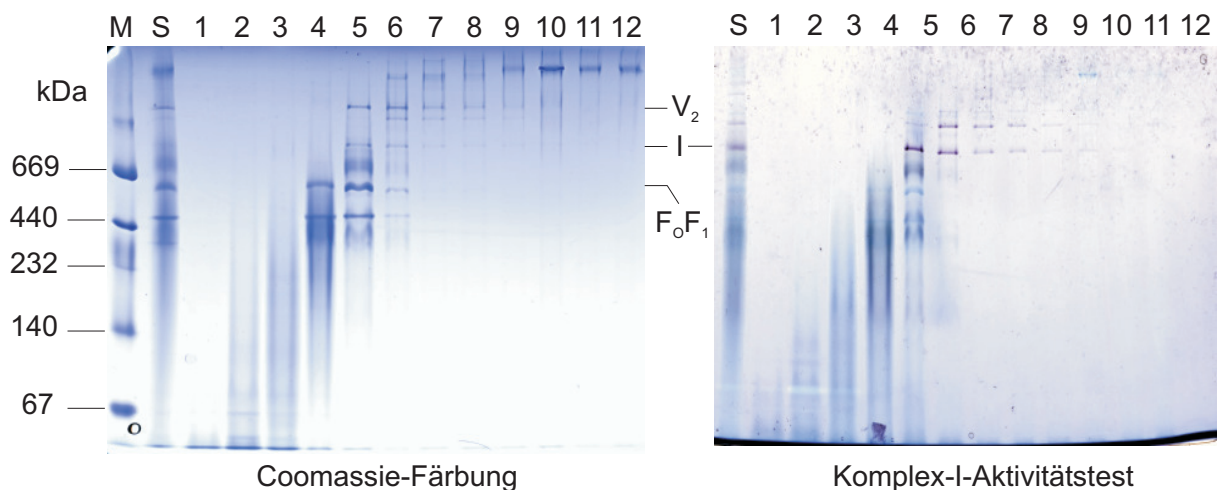


Abbildung 5.23: BN-Gele der per Saccharosedichtegradientenzentrifugation (15–55 % (w/v)) aufgetrennten Mitochondrienfraktionen (Abbildung 5.21 links). Zusätzlich zu den jeweiligen Fraktionen ist das nicht aufgereinigte Solubilisat (S) aufgetragen. Die Gele werden mit 16 μ L der entsprechenden unverdünnten Fraktionen, sowie mit 4 μ L des Solubilisates beladen. Ein BN-Gel wird mit Coomassie gefärbt (links), das andere in Komplex-I-Aktivitätstestlösung inkubiert (rechts). Das Coomassie gefärbte Gel enthält in Spur (M) den Proteinstandard HMW.

Der aufreinigende Effekt der Dichtegradientenzentrifugation ist deutlich zu erkennen, wenn man die Proteinbanden des Solubilisates mit den jeweiligen Banden der Fraktionen vergleicht. Beispielsweise zeichnet sich die Monomerbande der ATP-Synthase in den Fraktionen 4, 5 und 6 deutlich stärker ab als im Solubilisat (Bande leicht unterhalb der 669 kDa Bande). Entsprechend verhält es sich mit der Bande von Komplex I, welche im Solubilisat nur sehr schwach zu sehen ist und in den Fraktionen 5, 6 und 7 an Intensität gewinnt. Nach Inkubation des BN-Gels in Komplex-I-Aktivitätstestlösung ist dieser Unterschied noch besser erkennbar. Hier kann zusätzlich zu den Fraktionen 5, 6 und 7 noch aktiver Komplex I in den Fraktionen 8, 9 und 10 festgestellt werden. Anhand der intensiven Färbung der Komplex-I-Bande in den Frak-

tionen 5 und 6 beinhalten diese beiden Fraktionen den größten Anteil an Komplex I. Neben dem Monomer von Komplex I kann auch ein Superkomplex, der aktiven Komplex I enthält, in den Fraktionen 6–10 nachgewiesen werden. Das Dimer der ATP-Synthase ist ebenfalls nicht in einer Fraktion lokalisiert, sondern über mehrere verteilt (5–9). Des Weiteren ist verstärkt ab Fraktion 9 eine hochmolekulare Proteinbande zu entdecken, bei der es sich um eine oligomere Form der ATP-Synthase handeln könnte. Zur Klärung dieser Vermutung bedarf es allerdings noch weiterer Untersuchungen, deren Ergebnisse an anderer Stelle gezeigt und diskutiert werden. Zur näheren Charakterisierung der in den Fraktionen 5 und 6 enthaltenen Proteinbanden werden zusätzliche Aktivitätstests sowie denaturierende Gelelektrophoresen in der zweiten Dimension durchgeführt. Hierzu werden die Fraktionen 5 und 6 sowie frisch solubilisierter Mitochondrien aus *C. reinhardtii* auf ein BN-Gel aufgetragen und die Proben elektrophoretisch getrennt ($18 \times 16 \text{ cm}^2$, $T = 3,5\text{--}12\%$). Die Mitochondriensuspension wird mit Digitonin solubilisiert (Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis 30 g g^{-1}) und auf eine Chlorophyllkonzentration von $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ gebracht. Zum Nachweis von Enzymaktivitäten werden Gelstreifen mit den jeweiligen Fraktionen sowie des Solubisates in Aktivitätstestlösungen für die Komplexe I, IV und V inkubiert. Ein Teil des Gels wird mit Coomassie gefärbt.

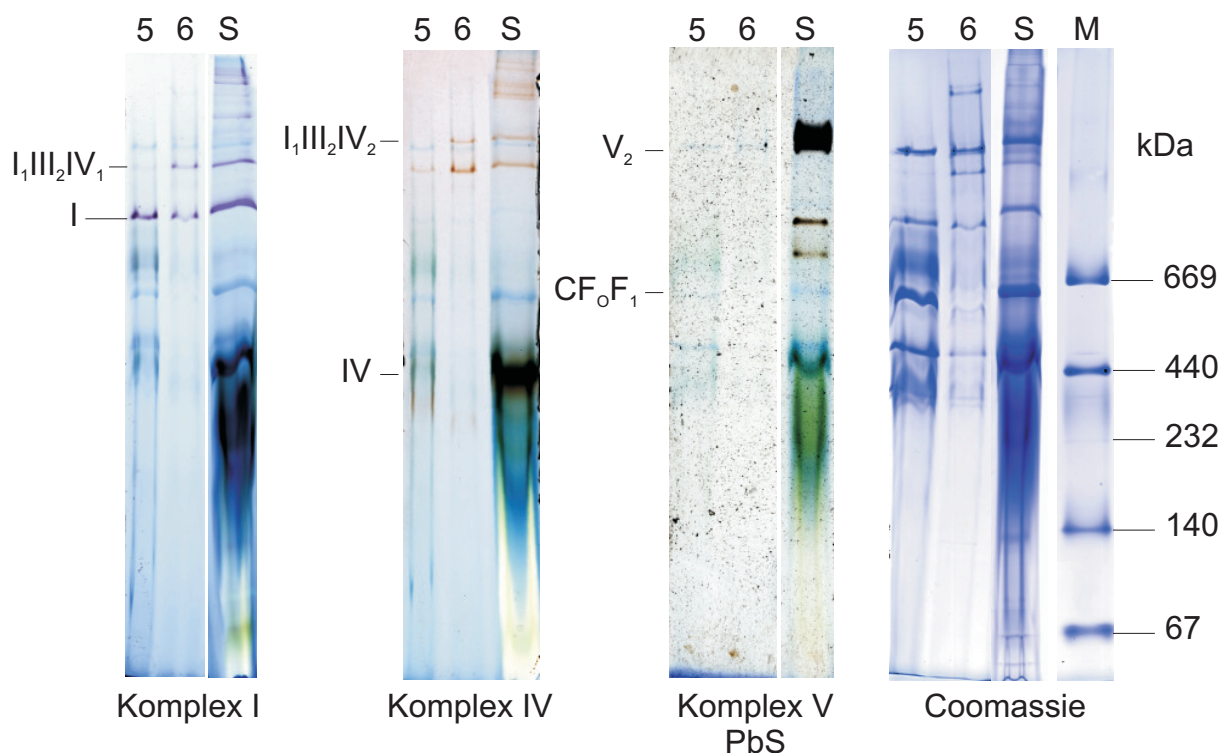


Abbildung 5.24: BN-Gel der per Saccharosedichtegradientenzentrifugation (15–55 % (w/v)) aufgetrennten Mitochondrienfraktionen 5 und 6 (Abbildung 5.21 links). Zusätzlich zu den beiden Fraktionen ist das entsprechende Solubilisat (S) aufgetragen. Zum Nachweis von Enzymaktivitäten werden Gelstreifen mit den jeweiligen Fraktionen, sowie dem Solubilisat in Aktivitätstestlösungen für die Komplexe I, IV und V inkubiert. Ein Teil des Gels, der eine Spur mit dem Proteinmarker HMW enthält (M), wird Coomassie gefärbt.

Mit Hilfe des Enzymaktivitätstests für Komplex IV können in Fraktion 6 und im Solubilisat zwei Superkomplexe, die aktiven Komplex IV enthalten, nachgewiesen werden. Hierbei handelt es

sich um die beiden Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ (S1) und $I_1III_2IV_2$ (S2). Für den Gelstreifen, der mit Komplex I Aktivitätstestlösung inkubiert wird, ist der Superkomplex S2 in Fraktion 6, wenn überhaupt, nur sehr schwach zu sehen. Im Solubilisat dagegen sind weitere Banden auszumachen, die sowohl mit Komplex I als auch mit Komplex IV Aktivitätstestlösung eine positive Reaktion zeigen. Bei diesen hochmolekularen Proteinkomplexbanden, die in beiden betrachteten Fraktionen fehlen, handelt es sich um weitere Superkomplexe, mit oligomeren Formen von Komplex I und IV. Zur Lokalisierung von ATP-Synthasen (Monomer und Dimer) wird ein indirekter Nachweis über die Hydrolyse von ATP zu ADP und P_i durch die ATP-Synthase angewandt. Durch Umsetzung des ausgefallenen Bleiphosphates mit Ammoniumsulfid zu Bleisulfid können entsprechende hydrolyseaktive Proteinbanden sichtbar gemacht werden. In den Fraktionen 5 und 6 können jedoch weder das Monomer, noch das Dimer der ATP-Synthase auf diese Weise nachgewiesen werden. Im Solubilisat dagegen zeichnet sich das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase deutlich als braune Bande ab. Auffällig sind hier zwei weitere Banden, die etwas unterhalb der Bande von Komplex I liegen. Hierbei handelt es sich nicht um das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase, da diese Bande etwas unterhalb von $(MF_0F_1)_2$ zu erwarten wäre. Erstaunlicherweise tauchen diese beiden Proteinbanden im Coomassie gefärbten Teil des Gels nicht auf. Hier ist lediglich die intensiv gefärbte Komplex-I-Bande festzustellen. Die per Enzymaktivitätstests erhaltenen Ergebnisse können durch Analyse der entsprechenden, in der zweiten denaturierenden Dimension aufgetrennten Fraktionen bestätigt werden.

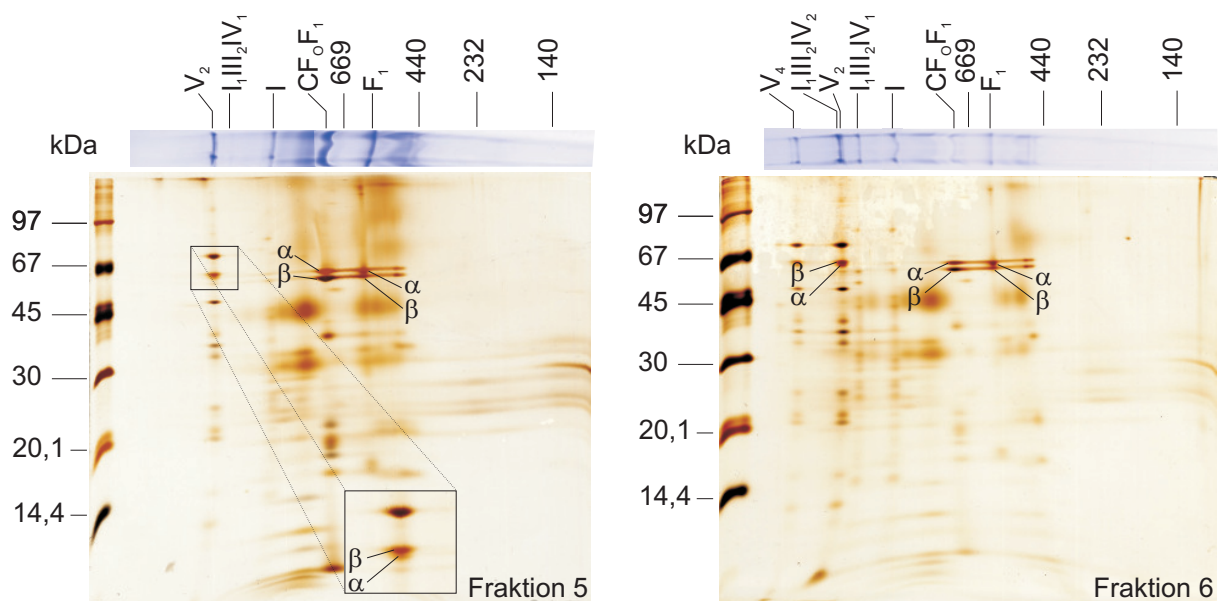


Abbildung 5.25: 2D-Tricin-SDS-Gele der *C. reinhardtii* Mitochondrienfraktionen 5 und 6 des Saccharosedichtegradienten (15–55 %, Abbildung 5.21 links). Die Gelstreifen der ersten nativen Dimension werden zur Denaturierung 1 h bei ZT mit einer Lösung aus 1 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Nach der Elektrophorese erfolgt eine Silber-Färbung der Gele.

Gut zu erkennen sind jeweils die α - und β -Untereinheiten der ATP-Synthasen. Hier kann auch zwischen mitochondrialer und Chloroplasten ATP-Synthase diskriminiert werden, da bei *C. reinhardtii* die β -UE der MF_0F_1 , im Unterschied zur β -UE der CF_0F_1 , eine höhere Masse als die

α -UE besitzt und zusätzlich der Massenunterschied zwischen diesen beiden Untereinheiten bei MF_0F_1 deutlich kleiner ist (CF_1 β -UE = 52 kDa, CF_1 α -UE = 54,8 kDa; MF_1 β -UE = 61,8 kDa, MF_1 α -UE = 61,4 kDa) ^[103,104]. Außerdem zeigen sich für Fraktion 6 im silbergefärbten 2D-Tricin-SDS-Gel neben den Untereinheiten von V_2 auch die von V_4 . Diese Fraktion enthält offensichtlich auch einen größeren Anteil von S1, da hier die entsprechenden Spots stärker ausgeprägt sind im Vergleich zu Fraktion 5. Untereinheiten des Superkomplexes S2 sind für Fraktion 6 in Abbildung 5.25 nicht zu sehen. Vermutlich ist der Anteil dieses Superkomplexes in Fraktion 6 relativ gering, und eventuell vorhandene Spots könnten von intensiver gefärbten Untereinheiten des mitochondrialen ATP-Synthase Dimers überdeckt sein. Ein Vergleich der beiden per 2D-SDS-PAGE getrennten Proteinfractionen mit dem ungereinigten Solubilisat zeigt deutlich den aufreinigenden Effekt der Dichtegradientenzentrifugation.

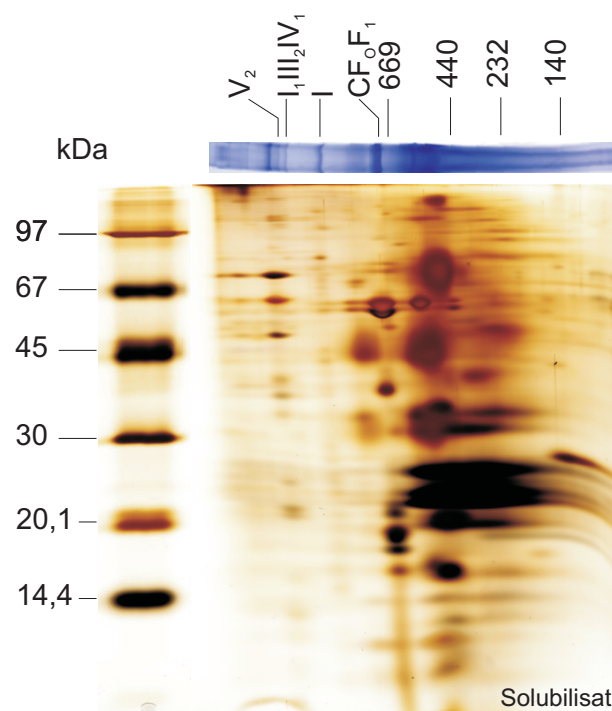


Abbildung 5.26: 2D-Tricin-SDS-Gel ($10,0 \times 10,5 \text{ cm}^2$) des *C. reinhardtii*-Mitochondriensolubilisates. Der Gelstreifen der ersten Mini-BN-Gel-Dimension wird zur Denaturierung 1 h bei ZT mit einer Lösung aus 1 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Nach der Elektrophorese erfolgt die Silber-Färbung des Gels.

Im Unterschied zu den oben beschriebenen 2D-SDS-Gelen der Proteinfractionen sind im Solubilisat sehr viele Proteinspots unterhalb 400 kDa auszumachen. Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnten somit diese Proteine abgetrennt werden. Protein(super)komplexe, die zum Teil relative kleine Masseunterschiede haben, lassen sich dagegen mit Dichtegradienten nur schwer trennen. Wie die beiden 2D-SDS-Gele der Fraktionen 5 und 6 zeigen (Abbildung 5.25), unterscheiden sie sich nur in Hinblick auf das Vorhandensein von Proteinkomplexen mit großen Massenunterschieden. So ist beispielsweise in Fraktion 6 zusätzlich zum Dimer das Tetramer der mitochondrialen ATP-Synthase (V_4) enthalten, in Fraktion 5 nicht.

5.3.2.2 *E. gracilis*

Neben Thylakoidmembranproteinen aus *C. reinhardtii* werden auch Proteingemische aus *E. gracilis* per Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Wie bei *C. reinhardtii* wird auch hier ein linearer Gradient mit 15–55 % (w/v) Saccharose eingesetzt. Die genaue Zusammensetzung des Mediums ist in Abschnitt 4.4.1 beschrieben. Für Dichtegradientenzentrifugationen erfolgt die Solubilisierung der *E. gracilis*-Chloroplasten mit DDM, für *E. gracilis*-Mitochondrien mit Digitonin. Die Solubilisierungsansätze werden auf eine Chlorophyll-Endkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ eingestellt und mit Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnissen von 20 g g^{-1} für DDM, bzw. 25 g g^{-1} für Digitonin solubilisiert. Jeweils 1 mL der resultierenden Solubilisate wird auf kontinuierliche Saccharosegradienten aufgetragen und 13,5 h bei $222000 \times g$ und 4°C im SW-41-Rotor zentrifugiert. Abbildung 5.27 zeigt das Ergebnis der Proteinauftrennung im Dichtegradienten.

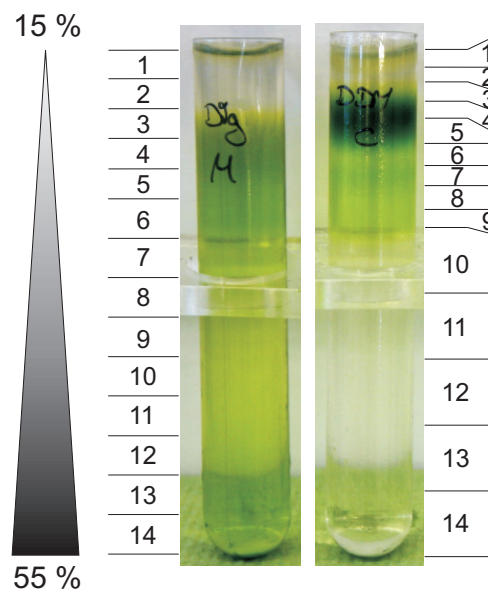


Abbildung 5.27: Lineare Dichtegradienten von 15 bis 55 % (w/v) Saccharose. Jeweils 1 mL solubilisierter Chloroplasten (rechts, 20 g DDM g^{-1} Chlorophyll) bzw. Mitochondrien (links, $25 \text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll) einer *E. gracilis*-Anzucht werden mit einer Chlorophyllkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ aufgetragen. Nach der Zentrifugation (13,5 h, $222000 \times g$, 4°C) erfolgt die Fraktionierung der Proben mit einer gewinkelten Pasteur-Glaspipette. Klar ersichtliche Banden werden separiert, farblose bzw. homogen gefärbte Bereiche zu jeweils gleichen Volumina portioniert (Mitochondrien ab Fraktion 6 zu je $600 \mu\text{L}$, Chloroplasten ab Fraktion 10 zu je 1 mL). Insgesamt werden für die Mitochondrien und Chloroplasten 14 Fraktionen erhalten.

In Analogie zur Dichtegradientenzentrifugation solubilisierter Organellen aus *C. reinhardtii* erkennt man für beide solubilisierten *E. gracilis*-Organellen unterschiedliche Bandenmuster im Gradienten. So erscheinen im Gradienten des Mitochondriensolubisates wenig diskrete Banden und die grünlich gefärbte Lösung reicht bis auf den Boden des Zentrifugenröhrchens. Im Chloroplastensolubisat dagegen zeichnen sich grüne Banden ab, und die untere Hälfte der Gradientenlösung ist farblos. Sowohl für die mit DDM solubilierte Chloroplasten-, als auch für die mit Digitonin solubilierte Mitochondrienprobe werden insgesamt 14 Fraktionen erhalten.

Mit Beginn des farblosen Bereichs des Chloroplastengradienten, erfolgt die Fraktionierung der Lösung zu jeweils 1 mL (ab Fraktion 10). Die Mitochondrienprobe wird ab Fraktion 6 zu je 600 μL portioniert.

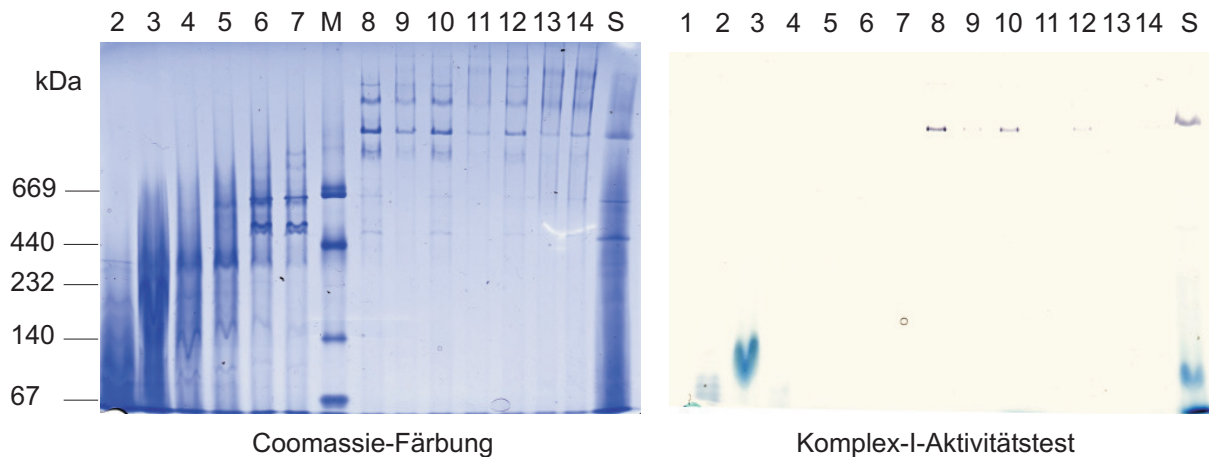


Abbildung 5.28: BN-Gele fraktionierter, mit 20 g DDM g⁻¹ Chlorophyll solubilisierter Proteine einer Chloroplastenprobe aus *E. gracilis*. Die Reinigung erfolgt über einen linearen Dichtegradienten von 15 bis 55 % (w/v) Saccharose (Abbildung 5.27 rechts). Jeweils 20 μL der 14 erhaltenen Fraktionen, sowie 5 μL des Chloroplastensolubisates (S) werden aufgetragen. Das Coomassie gefärbte BN-Gel (links) enthält die Fraktionen 2–14 sowie den Proteinstandard HMW (M), das auf Komplex-I-Aktivität hin untersuchte Gel (rechts) alle 14 Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation.

Die weitere Analyse der erhaltenen Fraktionen geschieht per Mini-BN-PAGE. Hierzu werden Mini-BN-Gele mit 20 μL der jeweiligen, unverdünnten Fraktionen, sowie mit 5 μL des nicht aufgetrennten Solubisates beladen. Abbildung 5.28 zeigt die gelelektrophoretisch getrennten Chloroplastenfraktionen. Zusätzlich zur Coomassie-Färbung wird ein Gel auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht. In den Fraktionen 1–7 findet man hauptsächlich Proteine mit Massen bis 669 kDa. Bei Betrachtung des Gradientenröhrchens rechts in Abbildung 5.27 fällt auf, dass es sich bei diesen Fraktionen um die deutlich grün gefärbten Banden handelt. Hier befindet sich somit der Großteil der Photosynthesekomplexe, die auf Grund der Solubilisierung mit DDM in ihre Subkomplexe zerfallen und weiter im BN-Gel wandern. Entsprechend legen diese Subkomplexe im Dichtegradienten eine relativ kurze Migrationsstrecke zurück. Ab Fraktion 8 sind dagegen Proteinkomplexe enthalten, deren Massen deutlich über 669 kDa liegen. Wie das auf Komplex-I-Aktivität hin analysierte BN-Gel zeigt (rechts in Abbildung 5.28), enthalten die Fraktionen 8, 9, 10 und 12 eine Proteinbande mit Komplex-I-Aktivität. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um das Monomer von Komplex I, da diese Bande mit einer Masse von etwa 1400 kDa deutlich über der für das Monomer erwarteten Masse von ca. 1000 kDa liegt. Erstaunlich ist hierbei die Tatsache, dass dieser Superkomplex, bei dem es sich aufgrund der Masse um I_1III_2 handeln könnte, stabil gegenüber der Solubilisierung mit DDM ist. Eine entsprechend durchgeführte Solubilisierung mit Organellen aus *C. reinhardtii* führt zum Zerfall Komplex-I-enthaltender Superkomplexe (siehe Abschnitt 5.3.2.1).

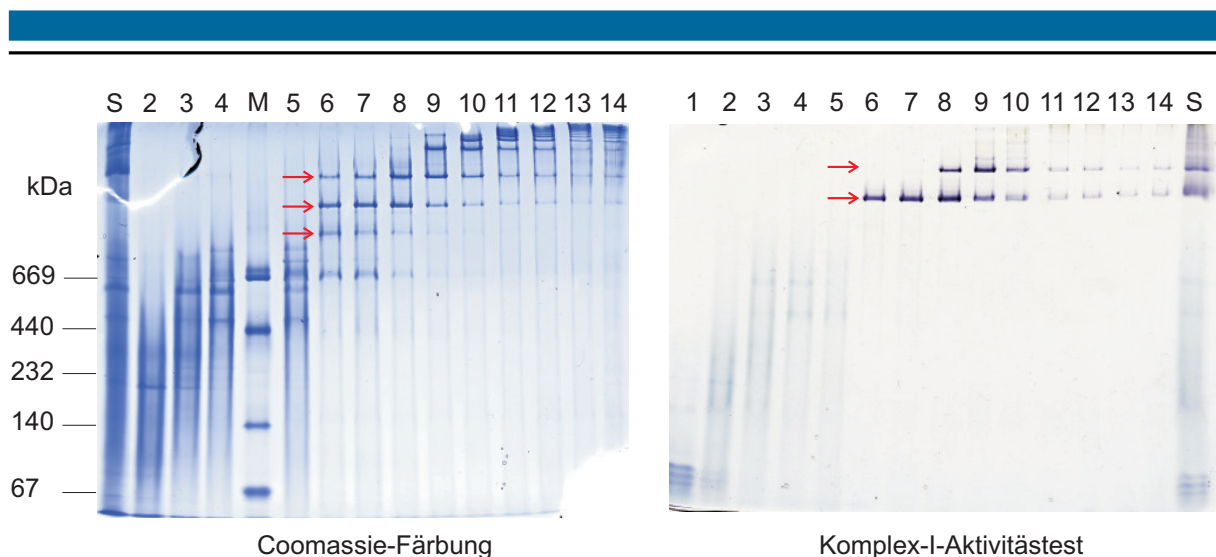


Abbildung 5.29: BN-Gele fraktionierter, mit 25 g Digitonin g⁻¹ Chlorophyll solubilisierter Proteine einer Mitochondrienprobe aus *E. gracilis*. Die Reinigung erfolgt über einen linearen Dichtegradienten von 15 bis 55 % (w/v) Saccharose (Abbildung 5.27 links). Jeweils 20 µL der 14 erhaltenen Fraktionen, sowie 5 µL des Chloroplastensolubisates (S) werden aufgetragen. Das Coomassie gefärbte BN-Gel (links) enthält die Fraktionen 2–14 sowie den Proteinstandard HMW (M), das auf Komplex-I-Aktivität hin untersuchte Gel (rechts) alle 14 Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation.

In Abbildung 5.29 ist das Ergebnis der per BN-PAGE getrennten Mitochondrienfraktionen gezeigt. Vor der Dichtegradientenzentrifugation wird die Suspension mit einem Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnis von 25 g g⁻¹ solubilisiert. Gut zu erkennen ist der große Anteil an Komplex-I-enthaltenden Proteinkomplexen. In Fraktion 6 und 7 findet man die Proteinbande wieder, die auch in Abbildung 5.28 aktiven Komplex I aufweist. Zusätzlich zu diesem Superkomplex taucht ab Fraktion 8 eine weitere Superkomplexbande auf, die ebenfalls aktive NADH-Dehydrogenase enthält. Die Masse dieser Bande liegt bei etwa 2000 kDa und ähnelt somit Superkomplex I₁III₂IV₂ oder I₁III₂IV₃. In den Fraktionen 9 und 10 können oberhalb der 2000 kDa Superkomplexbande noch weitere, durch die Komplex-I-Testlösung schwach gefärbte Proteinbanden ausgemacht werden. Merkwürdigerweise findet man im Coomassie gefärbten Gel in den Fraktionen 6 und 7 beide Superkomplexbanden, aber erst ab Fraktion 8 wird für den größeren Superkomplex Komplex-I-Aktivität festgestellt. Offensichtlich handelt es sich hierbei um einen Proteinkomplex gleicher Masse, der keinen Komplex I enthält. Denkbare Proteinkomplexe mit solch hohen Massen können aus dem Photosyntheseapparat stammen, z. B. Superkomplexe aus PSII und LHCII. Des Weiteren zeichnet sich eine Proteinbande in den Fraktionen 6, 7, 8 und 9 ab (unterer Pfeil links in Abbildung 5.29), die mit einer Masse von etwa 1000 kDa das Monomer von Komplex I vermuten lässt. Da diese Bande allerdings keine Komplex-I-Aktivität aufweist, muss es sich hierbei wieder um einen Proteinkomplex aus dem Photosyntheseapparat handeln. Der aufreinigende Effekt durch den linearen Dichtegradienten ist für die Mitochondrienproteine in Abbildung 5.29 gut zu erkennen, aber die einzelnen Fraktionen enthalten immer noch relativ viele verschiedene Proteinkomplexe. Aus diesem Grund wird eine solubilisierter Mitochondrienprobe per Stufengradient aufgetrennt, um somit die Anzahl verschiedener Proteinkomplexe innerhalb einer Fraktion zu verringern. 1 mL des *E. gracilis*-Mitochondriensolubisates (30 g Digitonin g⁻¹ Chlorophyll, 0,4 mg mL⁻¹ Chlorophyllkonzen-

tration) wird auf einen 5-stufigen Saccharosegradienten aufgetragen und im SW-41-Rotor zentrifugiert (18 h, $167000 \times g$, 4°C). Wie bei den beschriebenen kontinuierlichen Saccharosegradienten, wird auch hier der Gradientenlösung 0,02 % (w/v) des entsprechenden zur Solubilisierung verwendeten Detergens zugegeben. In Abbildung 5.30 sind die Gradienten nach der Zentrifugation gezeigt.

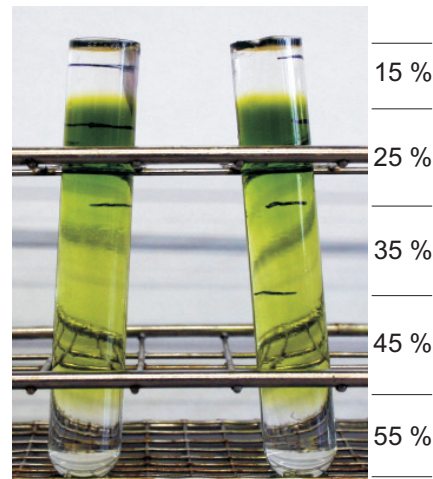


Abbildung 5.30: 5-stufiger Dichtegradient mit 15, 25, 35, 45 und 55 % (w/v) Saccharose. Auf die leichteste Stufe wird 1 mL Mitochondriensolubilisat aus *E. gracilis* aufgetragen. Die Solubilisierung wird mit $30 \text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll bei einer Chlorophyll-Endkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ durchgeführt. Nach der Zentrifugation (SW-41-Rotor, 18 h, $167000 \times g$, 4°C) werden die Stufen isoliert und gleiche Fraktionen vereint.

Sowohl die erste als auch die letzte Stufe des Dichtegradienten sind farblos. Die 25 % Fraktion weist die stärkste Grünfärbung innerhalb des Gradienten auf, die Stufen mit 35 und 45 % (w/v) Saccharose sind in gleichem Maße hellgrün gefärbt. Zur weiteren Analyse erfolgt zunächst die Isolierung der einzelnen Gradientenstufen mit Hilfe einer Glaspipette mit gebogener Spitze. Identische Fraktionen werden nun vereint und per BN-PAGE untersucht. Das BN-Gel wird hierzu mit je $30 \mu\text{L}$ der fünf Gradientenstufen, sowie $15 \mu\text{L}$ des ungereinigten Mitochondriensolubisates beladen. Neben der anschließenden Coomassie-Färbung werden *In-Gel*-Aktivitätstests bezüglich der Komplexe I und IV durchgeführt. In Abbildung 5.31 sind die Ergebnisse der jeweiligen Färbungen gezeigt. Es zeigt sich, dass die farblosen Bereiche des Stufengradienten (15 und 55 %-Stufe in Abbildung 5.30 bzw. Fraktion 1 und 5 in Abbildung 5.31) nahezu keine Proteine enthalten. Die zweite Stufe, die am stärksten grün gefärbt ist, enthält hauptsächlich RuBisCO. Ab Fraktion 3, also der 35 %-Stufe, kommen Superkomplexbanden zum Vorschein. Zum einen können zwei Komplex-I-enthaltende Proteinbanden festgestellt werden, die im gleichen Massenbereich wie die beiden Superkomplexe der Fraktionen 8–14 des kontinuierlichen Dichtegradienten (Abbildung 5.29) liegen. Zum anderen erkennt man zwei weitere Banden, die in Folge des Aktivitätstests auf Komplex IV schwach braun gefärbt sind. Diese beiden Komplex-IV-enthaltenden Proteinbanden konnten im Coomassie gefärbten Gel der Fraktionen des linearen Dichtegradienten nicht gefunden werden. Ein Grund dafür, diese bei-

den Banden im Stufengradienten, nicht jedoch im linearen Gradienten finden zu können, liegt eventuell im konzentrierenden Effekt eines Stufengradienten.

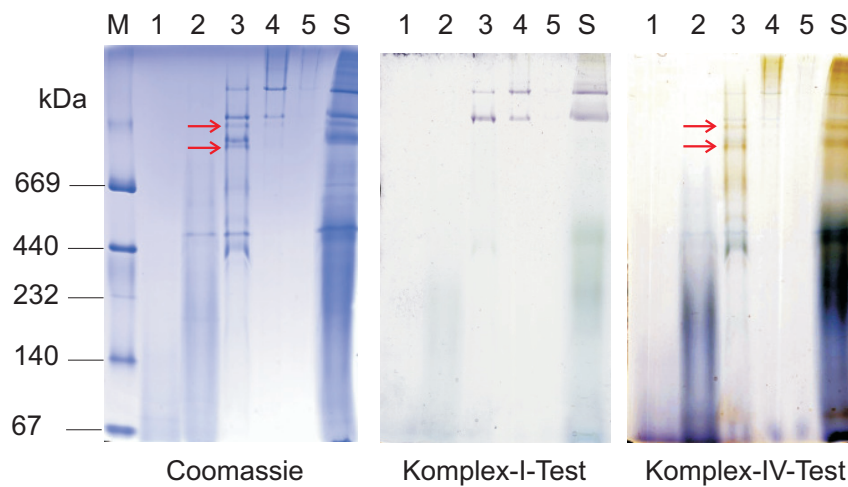


Abbildung 5.31: BN-Gele der per Stufengradientenzentrifugation gereinigten *E. gracilis*-Mitochondrienprobe (Abbildung 5.30). In Spur 1 ist die leichteste 15 % (w/v) Saccharose-Stufe aufgetragen, in den folgenden Spuren 2–5 die schwereren Stufen mit 25, 35, 45 und 55 % (w/v) Saccharose (je 30 μ L). Die mit S bezeichnete Spur enthält 15 μ L des ungereinigten Mitochondriensolubilisates, das mit 30 g Digitonin g^{-1} Chlorophyll bei einer Chlorophyll-Endkonzentration von 0,4 mg mL^{-1} solubilisiert worden ist. Zusätzlich zur Coomassie Färbung eines BN-Gels erfolgen *In-Gel*-Aktivitätstests für die Komplexe I und IV (Mitte, rechts). Die roten Pfeile deuten auf Komplex-IV-enhaltende Superkomplexe hin. Die mit (M) bezeichnete Spur links enthält den Proteinstandard HMW.

Anders als in einem linearen Gradienten, der keine diskreten Dichtestufen besitzt, erfolgt in einem Stufengradienten an Grenzflächen unterschiedlicher Saccharosedichten eine Konzentrierung der Teilchen, deren Dichte geringer ist als die der folgenden Stufe. Somit ist es möglich, dass diese beiden schwachen Banden zwar auch im kontinuierlichen Gradienten vorhanden sind, dort aber auf mehrere Fraktionen verteilt wurden und dadurch stark verdünnt worden sind. Im Stufengradienten hingegen erfolgt eine Konzentrierung dieser beiden Komplex-IV-enhaltenden Proteinkomplexe, sodass deren Detektion im Coomassie gefärbten Gel möglich wird. Neben dem Einsatz eines Stufengradienten könnte auch die Erhöhung des Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnisses der Solubilisierung von 25 g g^{-1} im kontinuierlichen Gradienten auf 30 g g^{-1} im Diskontinuierlichen zur Detektion der beiden Superkomplexe mit Komplex-IV-Aktivität geführt haben. Die leichte Erhöhung der Detergenskonzentration führt zu einer effizienteren Solubilisierung der Mitochondrienmembran, sodass diese beiden Superkomplexe, zusätzlich zu den Komplex-I-enhaltenden, in Lösung gehen können. Die Erhöhung der Digitoninkonzentration hat allerdings auch einen anderen Effekt. Die im linearen Gradienten noch vorhandenen hochmolekularen Superkomplexe (ab Fraktion 9 in Abbildung 5.29) sind hier offensichtlich durch Dissoziation in kleinere Superkomplexe zerfallen. Diese Tatsache kann aber insofern als Vorteil genutzt werden, dass im Vergleich zu den Fraktionen des linearen Gradienten hier in Fraktion 4 eine relativ saubere Probe erhalten wird, die zwei Superkomplexe mit aktiver NADH-Dehydrogenase enthält. Eine solche Probe eignet sich für strukturaufklärende Untersuchungen mit Hilfe der Elektronenmikroskopie im Unterschied zu den Fraktionen aus

dem kontinuierlichen Gradienten. Die Ergebnisse hierzu werden an anderer Stelle in dieser Arbeit gezeigt.

5.3.2.3 *N. muscorum*

Neben Membranproteinen aus Grünalgen erfolgt auch die Aufreinigung von Thylakoidproteinen aus Cyanobakterien per Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu werden Thylakoide aus *N. muscorum* entsprechend Abschnitt 5.2.4.2 auf Seite 82 mit DDM bzw. Digitonin solubilisiert und über einen kontinuierlichen Dichtegradienten aus Saccharose (15–55 % (w/v)) gereinigt. Insgesamt werden vier Gradienten mit jeweils 1 mL solubilisierter Thylakoidmembranen beladen, zwei mit DDM-Solubilisat und zwei mit Digitonin-Solubilisat. Die Zentrifugation erfolgt im SW-41-Rotor für 17 h bei $177000 \times g$ und 4°C . Abbildung 5.32 zeigt die Gradienten nach der Zentrifugation. Der DDM-Gradient wird in 15 Fraktionen aufgeteilt, der Digitonin-Gradient in 16 Fraktionen.

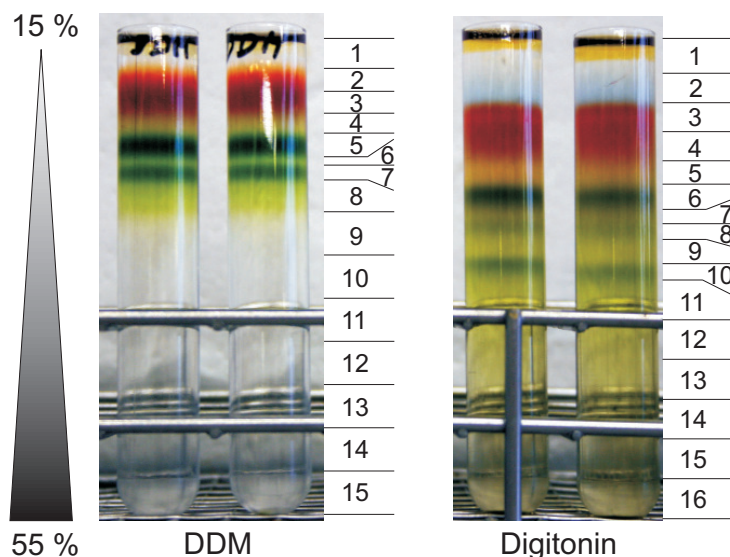


Abbildung 5.32: Jeweils 1 mL solubilisierter Thylakoide (links 25 g DDM g^{-1} Chlorophyll; rechts $20 \text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll) einer Anzucht von *N. muscorum* werden oben auf einen linearen Dichtegradienten (15 bis 55 % (w/v) Saccharose) aufgetragen. Nach der Zentrifugation (17 h, $177000 \times g$, 4°C) erfolgt die Fraktionierung der Proben von oben nach unten im Röhrchen mit einer gewinkelten Pasteur-Glaspipette. Klar ersichtliche Banden werden separiert, farblose oder homogene Bereiche zu jeweils 1 mL portioniert. Insgesamt werden für den DDM-Gradienten 15, für den Digitonin-Gradienten 16 Fraktionen erhalten.

Wie bei bereits oben diskutierten Dichtegradienten erkennt man auch hier deutliche Unterschiede bezüglich der Wahl des Detergens zur Solubilisierung. Die mit DDM-Solubilisat beladenen Röhrchen enthalten in der oberen Hälfte farbige Proteinbanden, wohingegen das Röhrchen mit Digitonin-Solubilisat auch in der unteren Hälfte, also bei höheren Mediumdichten, Banden erkennen lässt. Dieser Sachverhalt spricht wieder dafür, dass der Einsatz des stärkeren Detergens DDM zur Dissoziation hochmolekularer Proteinkomplexe in die entsprechenden Subkomplexe führt. Das milde Detergens Digitonin dagegen solubilisiert diese Komplexe in ihrer nativen, hochmolekularen Form, welche auf Grund ihrer größeren Masse

weiter innerhalb des Dichtegradienten wandern. Neben grünlich gefärbten Proteinkomplexen des Photosyntheseapparates zeichnen sich rote und bläulich (nur bei Digitonin) gefärbte Banden ab, welche auf die in Cyanobakterien vorhandenen Phycobilisomen zurückzuführen sind. Im DDM-Solubilisat werden offensichtlich die Phycocyanin-enthaltenden Proteine (blaue Färbung) von Phycoerythrin-enthaltenden (rote Färbung) überdeckt. Im Digitonin-Solubilisat dagegen kann man zwischen beiden Phycobilinen diskriminieren. Die weitere Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgt per BN-PAGE. In Abbildung 5.33 sind die gelelektrophoretisch getrennten Dichtegradienten-Fractionen der DDM-Solubilisierung gezeigt. Bei den beiden oberen Gelen handelt es sich um ungefärbte, direkt nach dem Gellauf dokumentierte Gele. Darunter befinden sich die selben Gele nach der Färbung mit Coomassie. In den ungefärbten BN-Gele, die direkt nach dem Gellauf dokumentiert worden sind, erkennt man sehr gut grün gefärbte Proteinbanden des Photosyntheseapparates von *N. muscorum*. Diese Photosystembanden erstrecken sich über die Fraktionen 4 bis 8 und sehr schwach in Fraktion 9. Keine dieser Banden weist eine höhere Masse als 669 kDa auf. Die im Dichtegradienten rötlich

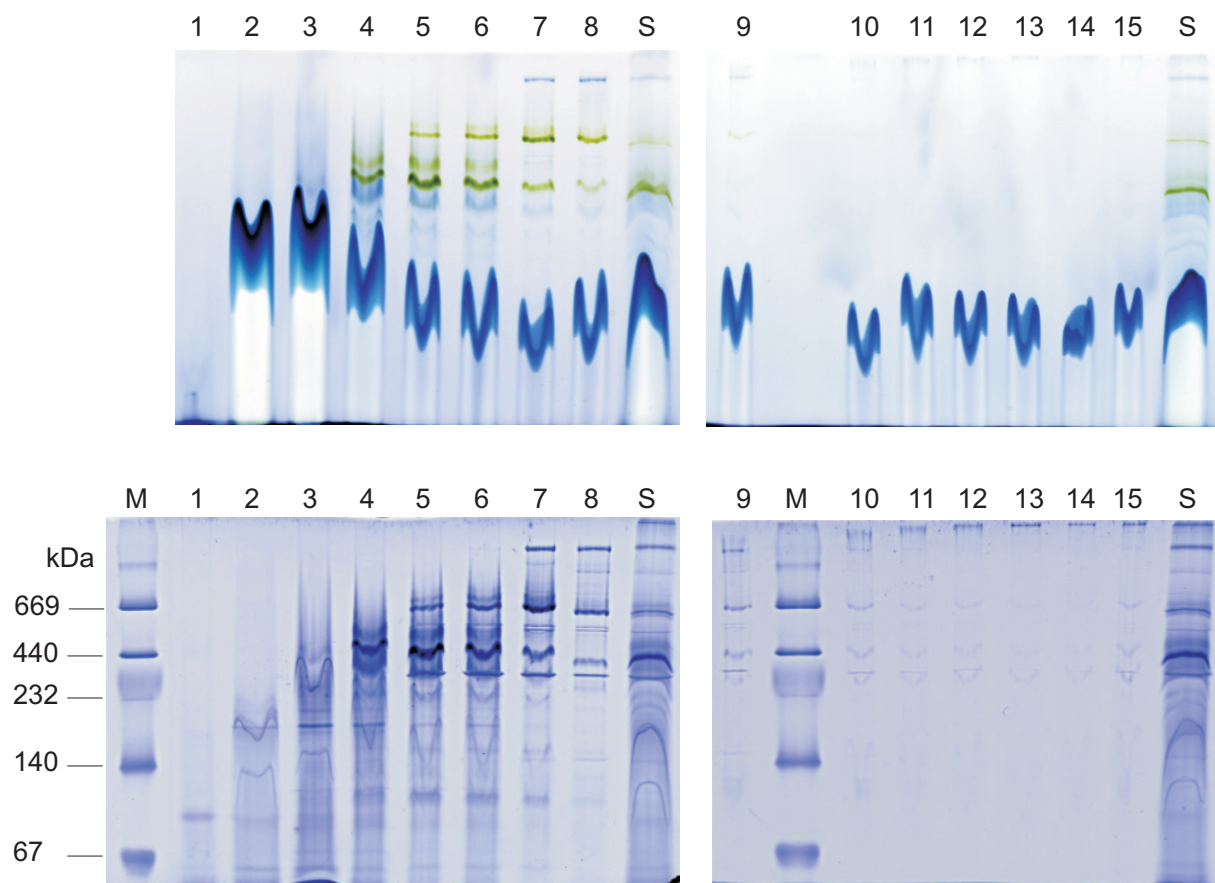


Abbildung 5.33: BN-PAGE der per Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 5.32 links) erhaltenen Fraktionen (1–15) des DDM-Solubilisates aus Thylakoiden von *N. muscorum*. Zusätzlich wird das ungeeignete Solubilisat (S) aufgetragen. Die Gele werden mit 30 μL der jeweiligen Fraktion, sowie mit 10 μL des Solubilisates (0, 12 mg mL^{-1}) beladen. Nach dem Gellauf werden die Gele im ungefärbten Zustand dokumentiert (obere Gele) und anschließend mit Coomassie gefärbt (untere Gele). Die mit (M) bezeichneten Spuren enthalten den Proteinstandard HMW.

gefärbten Bereiche in den Fraktionen 1 bis 3 sind auf Phycoerythrin-enhaltende Phycobiline zurückzuführen, welche im gefärbten BN-Gel Banden im niedermolekularen Bereich aufweisen. Das ungefärbte Gel zeigt für diese drei Fraktionen, im Unterschied zu grünen Photosystem-Proteinbanden, keine sichtbare Färbung. Auffällig ist weiterhin eine intensive Bande in den Fraktionen 7, 8 und 9, die eine deutlich höhere Masse als 669 kDa besitzt. Es ist allerdings fraglich, ob es sich hierbei um das Dimer der ATP-Synthase handelt, da bereits in einer anderen Arbeit^[19] dieses nicht identifiziert werden konnte. Aus Gründen der Vollständigkeit werden hierzu Antikörpertests durchgeführt deren Ergebnisse an andere Stelle in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Vermutung, dass nach Fraktion 9 des DDM-Dichtegradienten nur noch wenig Protein zu finden sein wird, bestätigt sich mit der gelelektrophoretischen Analyse. Das portionsweise Abnehmen der Fraktionen 9–15 (jeweils 1 mL) führt dazu, dass immer ein Teil von Fraktion 9 mitgenommen wird. Dies spiegelt sich auch im immer wieder auftretenden Proteinbandenmuster für die Fraktionen 9–15 wieder. Abbildung 5.34 zeigt die gelelektrophoretisch aufgetrennten Dichtegradienten-Fraktionen des Solubilisierungsansatzes mit Digitonin als Detergens. Auch hier handelt es sich im oberen Teil der Abbildung um die ungefärbten, direkt nach der BN-PAGE dokumentierten Gele, welche anschließend mit Coomassie gefärbt werden (unterer Teil in Abbildung 5.34).

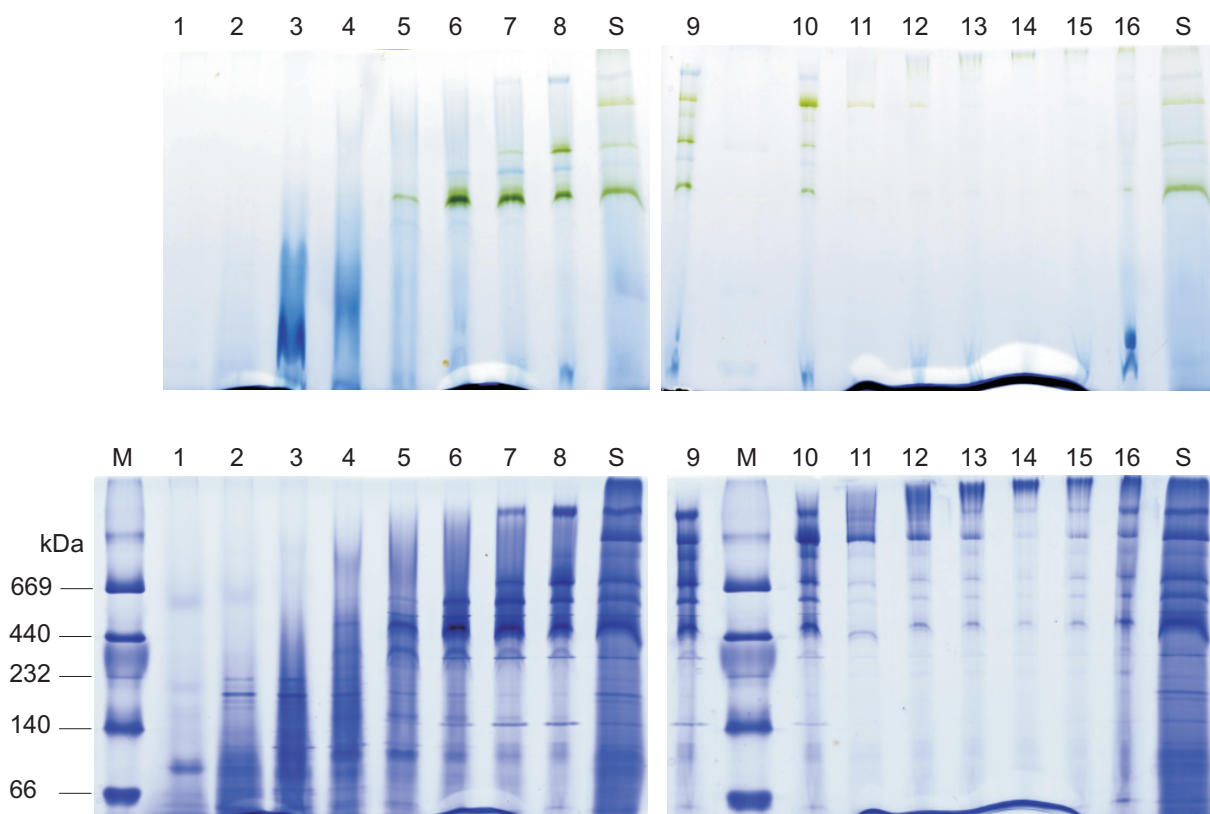


Abbildung 5.34: BN-PAGE der per Dichtegradientenzentrifugation (Abbildung 5.32 rechts) erhaltenen Fraktionen (1–16) des Digitonin-Solubilisates aus Thylakoiden von *N. muscorum*. Zusätzlich wird das ungereinigte Solubilisat (S) aufgetragen. Die Gele werden mit 30 μ L der jeweiligen Fraktion, sowie mit 10 μ L des Solubilisates (0, 12 mg mL⁻¹) beladen. Nach dem Gellauf werden die Gele im ungefärbten Zustand dokumentiert (obere Gele) und anschließend mit Coomassie gefärbt (untere Gele). Die mit (M) bezeichneten Spuren enthalten den Proteinstandard HMW.

Die hochmolekulare Proteinbande, die in den Fraktionen 7, 8 und 9 des DDM-Gradienten zu finden ist, taucht ebenfalls im Digitonin-Gradienten auf (Fraktionen 8, 9 und 10). Offensichtlich handelt es sich hierbei um einen stabilen Proteinkomplex, der selbst bei erhöhter Konzentration an DDM nicht dissoziiert. Anders sieht dies bei Komplexen der Photosysteme aus. Hier ist das mildere Detergens Digitonin in der Lage, diese Komplexe in ihrer nativen Form zu solubilisieren. Anhand der grünen Bande oberhalb 669 kDa im oberen Teil von Abbildung 5.34 (Fraktionen 9, 10 und 11) ist dies deutlich zu erkennen. Ebenfalls können, im Unterschied zum DDM-Gradienten, für die ersten drei Fraktionen mehr Proteinbanden festgestellt werden, welche auf die in diesen Fraktionen enthaltenen Phycobiline zurückzuführen sind. Allerdings kann auch hier im ungefärbten Gel, wie für die Fraktionen der DDM-Solubilisierung, keine Färbung der Proteinbanden durch Phycoerythrin bzw. Phycocyanin beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Dichtegradientenzentrifugationen solubilisierter Membranproteine aus den Grünalgen *C. reinhardtii* und *E. gracilis* (Abschnitte 5.3.2.1 und 5.3.2.2), sowie dem Cyanobakterium *N. muscorum* zeigen, dass mit dieser Methode ein deutlicher Aufreinigungseffekt erzielt wird. Die einzelnen Fraktionen weisen in der Regel eine relativ geringe Anzahl verschiedener Proteine im Unterschied zu den entsprechenden nicht gereinigten Solubilisaten auf. Für strukturelle Analysen z. B. per Elektronenmikroskopie ist dieser Reinigungsgrad allerdings noch nicht ausreichend. Da für die EM neben einer hohen Reinheit auch relativ hohe Konzentrationen des zu untersuchenden Proteins benötigt werden, eignen sich klassische Chromatographietechniken zur Proteinreinigung nur bedingt. Hier werden zwar hohe Reinheiten erzielt, die Konzentration an gereinigtem Protein ist aber meist für die EM zu gering. Eine gute Alternative zur eher aufwendigen Chromatographie stellt die Elution von Proteinkomplexen aus PA-Gelen dar. Auch hier werden hohe Reinheiten bei deutlich geringerem Probenverlust erzielt, und nach Konzentrierung der Probe eignet sich diese für strukturelle Analysen per EM. In Abschnitt 5.4 werden die Ergebnisse der durchgeführten Proteinelutionen vorgestellt.

5.4 Elution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen

Wie bereits angesprochen, ist es für strukturelle Untersuchungen von Proteinkomplexen per EM vonnöten, dass die Komplexe sehr rein und in ausreichend hoher Konzentration vorliegen. Diese Anforderungen konnten mit Hilfe der Dichtegradientenaufreinigung nur bedingt erfüllt werden. Eine andere Methode ist die Elution von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen, bei der man sich die hohe Trennleistung der Gelelektrophorese zunutze macht. Durch gezieltes Ausschneiden der interessierenden Proteinbande aus dem Gel und Elution des Proteins hieraus, ist man in der Lage, auch relativ nahe beieinander liegende Proteinkomplexe in hoher Reinheit zu isolieren. In diesem Kapitel werden in Hinblick auf elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen pflanzlicher Proteinkomplexe die Ergebnisse verschieden durchgeführter Elutionen vorgestellt und diskutiert.

5.4.1 Diffusionselution

Untersuchungen haben gezeigt^[69], dass die Elution der intakten Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat per Diffusion besser geeignet ist als die weniger aufwendige Elektroelution. Aus diesem Grund wird zur Elution von Protein(super)komplexen aus nativen PA-Gelen zunächst ebenfalls diese schonendere Elutionsvariante gewählt. In Abbildung 5.35 ist ein präparatives BN-Gel ($18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke 5,8 mm) gezeigt, das mit solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* beladen worden ist. Nach der Elektrophorese werden zwei schmale Streifen in Komplex-I- bzw. Komplex-IV-Testpuffer inkubiert. Deutlich sind hier die Superkomplexe $I_1III_2IV_1$ sowie $I_1III_2IV_2$ zu erkennen. Ebenfalls deutlich zu sehen ist das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase, das sich zwischen diesen beiden Superkomplexen als blaue Bande im direkt nach der Elektrophorese dokumentierten BN-Gel abzeichnet. Diese Bande wird ausgeschnitten und der darin enthaltene Proteinkomplex per Diffusion entsprechend Abschnitt 4.11.1 auf Seite 69 eluiert. Das erhaltene Eluat muss anschließend per Ultrafiltration

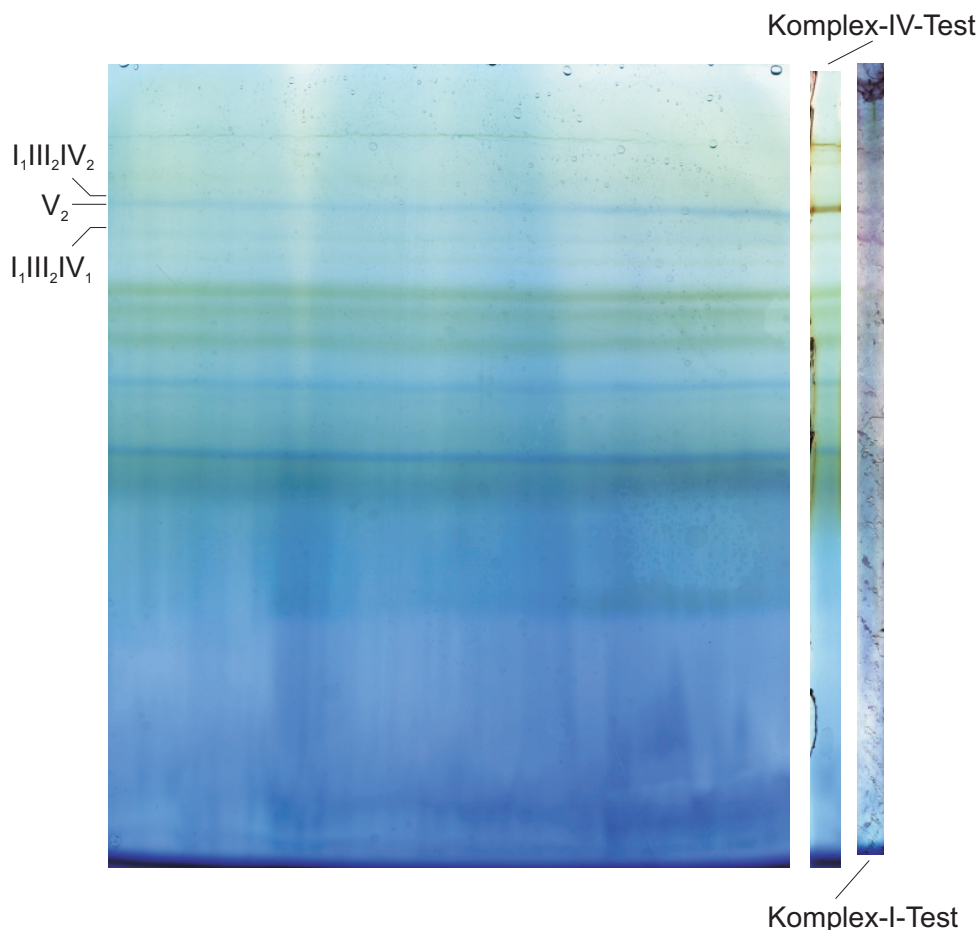


Abbildung 5.35: Präparatives BN-Gel ($18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke 5,8 mm), das mit 2,8 mL Mitochondrien-Solubilisat (1,5 % (w/v) Digitonin, Chlorophyllkonzentration $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) aus *C. reinhardtii* beladen worden ist. Die Dokumentation des Gels erfolgt direkt nach der Elektrophorese. Zur Lokalisierung von Superkomplexen im Gel werden zwei schmale Streifen (rechts) in Komplex I bzw. Komplex IV Testpuffer inkubiert.

konzentriert werden. Der isolierte und konzentrierte Proteinkomplex wird nun gelelektrophoretisch analysiert (Abbildung 5.36). Die Probe wird sowohl auf ein BN-, als auch auf ein CN-Mini-Gel aufgetragen und jeweils auf *In-Gel*-Enzymaktivität der Komplexe I, IV und V hin untersucht. Auf diese Weise kann ermittelt werden, wie exakt die Dimerbande der mitochondrialen ATP-Synthase ausgestochen worden ist. Schließlich liegt die Superkomplexbande $I_1III_2IV_2$ im BN-Gel relativ nahe an V_2 . Das Proteinmuster des Konzentrates und des Solubilisates ist im Coomassie gefärbten BN- und CN-Gel in diesem Fall relativ ähnlich. Unterschiede zwischen beiden Elektrophoresearten erkennt man bei Betrachtung der Gelstreifen, die auf Enzymaktivität hin untersucht worden sind. Im Unterschied zum Konzentrat im BN-Gel (rechts in Abbildung 5.36), weist die Dimerbande der mitochondrialen ATP-Synthase im CN-Gel eine deutliche Hydrolyse-Aktivität auf. Allerdings kann in BN-Gelen die weiße Färbung der Komplex-V-Bande beim Hydrolyse-Test durch vorhandenes Coomassie gestört werden. Aktivität bezüglich Komplex IV kann sowohl im CN-, als auch im BN-Gel nicht festgestellt werden. Obwohl nur eine Bande aus dem präparativen BN-Gel in Abbildung 5.35 ausgeschnitten und eluiert worden ist, erkennt man im Konzentrat zwei Proteinbanden, die beide sowohl im CN- als auch im BN-Gel Komplex-I-Aktivität zeigen. Da das Vorhandensein Komplex-V-enthaltender Superkomplexe aus der Literatur nicht bekannt ist, ist offensichtlich neben der $(MF_0F_1)_2$ -Bande auch die etwas darüber liegende Bande des Superkomplexes $I_1III_2IV_2$ mit ausgeschnitten und eluiert worden.

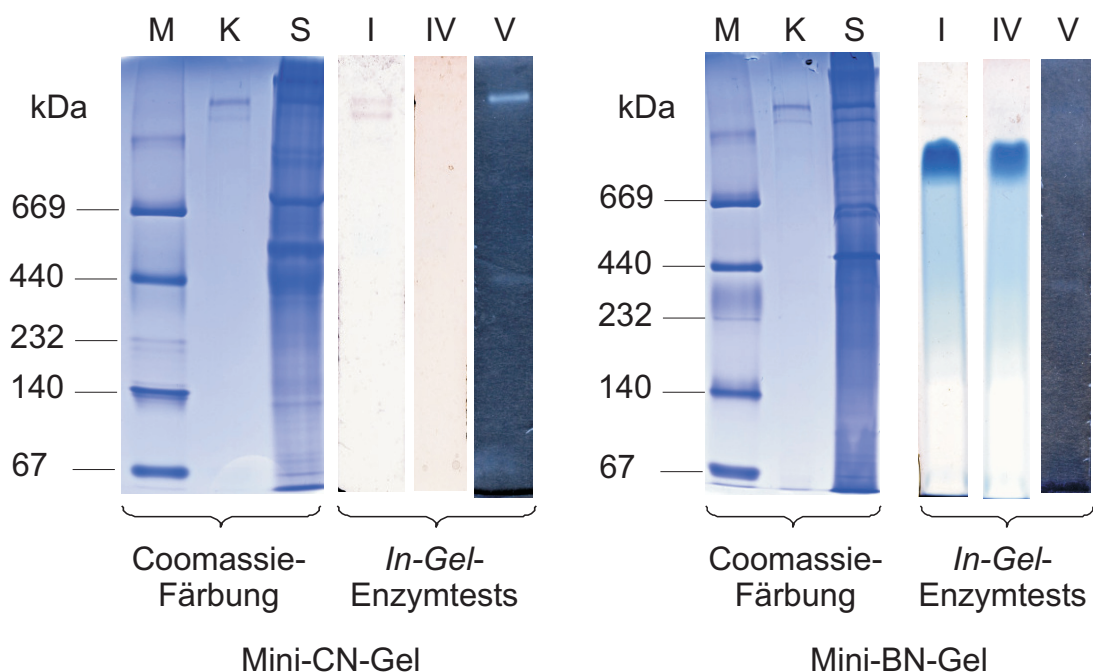


Abbildung 5.36: Gelelektrophoretische Analyse eines per Diffusion eluierten und anschließend per Ultrafiltration konzentrierten Proteinkomplexes (K) aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien (siehe Abbildung 5.35). Es handelt sich hierbei um das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase. Der eluierte Proteinkomplex wird auf Enzymaktivität für die Komplexe I, IV und V hin untersucht. Zusätzlich zum Konzentrat sind die mit Coomassie gefärbten Gelstreifen, sowohl das CN- (links) als auch das BN-Gel (rechts), mit Mitochondriensolubilisat (S) beladen worden. Die mit (M) bezeichneten Spuren enthalten den Proteinstandard HMW.

Das Auftauchen der zweiten Superkomplexbande mit geringerer Masse ist darauf zurückzuführen, dass es während der Elution und Konzentrierung der Probe zu einer teilweisen Dissoziation von Superkomplex S2 zu Superkomplex S1 gekommen ist. Dass diese zweite, leichtere Superkomplexbande ebenfalls durch ungenaues Ausschneiden der zu eluierenden Bande entstanden sein könnte, ist eher unwahrscheinlich, da der Massenunterschied zwischen S1 und $(MF_0F_1)_2$ groß genug ist, um zwischen diesen Banden differenzieren zu können.

Aus anderen Arbeiten^[66,67] ist bekannt, dass eine Erhöhung der Konzentration an Coomassie G-250 zum Zerfall von Chloroplasten-ATP-Synthasen in deren Subkomplexe F_0 und F_1 führt. Hierauf basierend könnte ein Grund für die Dissoziation von S2 zu S1 aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien während der Diffusionselution darin bestehen, dass durch die abschließende Konzentrierung der Probe automatisch auch die Konzentration an Coomassie, das aus der präparativen BN-PAGE stammt, erhöht wird. Diese erhöhte Coomassie-Konzentration könnte sich negativ auf die Stabilität von S2 auswirken und dessen teilweise Dissoziation induzieren. Durch den Einsatz der präparativen CN-PAGE kann eine auf Coomassie zurückzuführende Dissoziation von Superkomplexen ausgeschlossen werden. In Abbildung 5.37 sind zwei präparative CN-Gele gezeigt, die mit solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* bzw. aus *E. gracilis* beladen

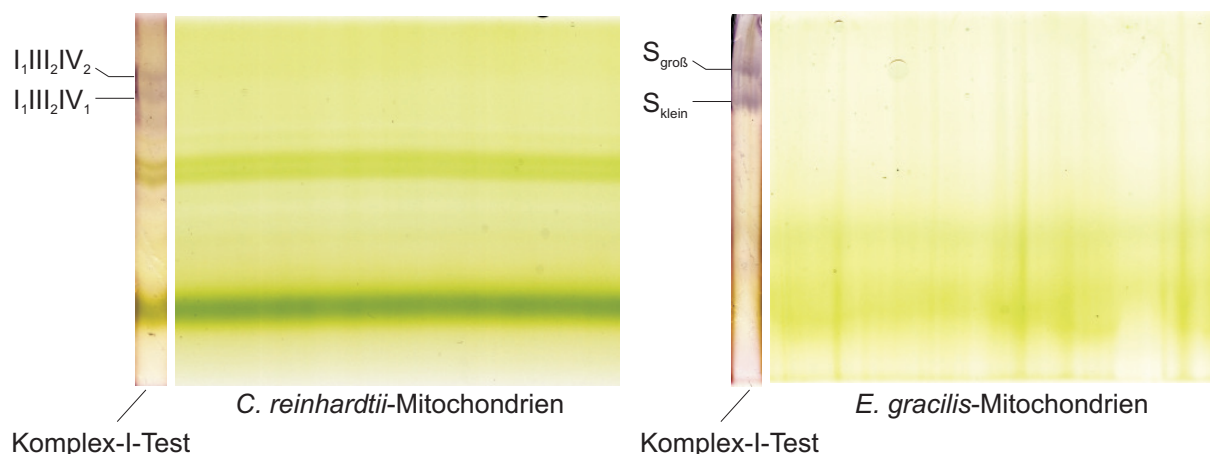


Abbildung 5.37: Ausschnitte präparativer CN-Gele ($18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke $5,8 \text{ mm}$), die mit je $2,8 \text{ mL}$ solubilisierter Mitochondrien ($1,5 \text{ \% (w/v)}$ Digitonin, Chlorophyllkonzentration $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) aus *C. reinhardtii* bzw. *E. gracilis* beladen worden sind. Die Dokumentation der Gele erfolgt direkt nach der Elektrophorese. Zur Lokalisierung von Superkomplexen im Gel wird je ein schmaler Streifen im Komplex-I-Testpuffer inkubiert. Zur Erleichterung der Proteinelution wird die Elektrophorese gestoppt, wenn die Lauffront etwa zur Hälfte durch das Gel gelaufen ist.

worden sind. Die Elektrophorese wird gestoppt, nachdem die Lauffront etwa die Hälfte des präparativen CN-Gels durchlaufen hat. Dadurch erreicht man, dass Proteinkomplexe weniger stark im Gel verankert sind und sich somit leichter aus der Gelmatrix eluieren lassen. In CN-Gelen ist das Auffinden von Proteinbanden dadurch erschwert, dass nur Proteine, die Chromophore wie z. B. Chlorophyll enthalten, direkt zu sehen sind. Zur Elution von Komplex-I-enthaltenden Superkomplexen muss man sich direkt an den in NADH-Dehydrogenase-Testpuffer inkubierten Referenzstreifen orientieren. Aus beiden präparativen CN-Gelen aus Abbildung 5.37 werden auf

Höhe der angezeigten Superkomplexe der Referenzstreifen die Banden ausgeschnitten, eluiert und konzentriert. In Abbildung 5.38 zeigt sich, dass trotz der milden CN-PAGE sowohl im präparativen Gel als auch anschließend im analytischen nur der Superkomplex aus *E. gracilis* (S_{klein} , Spur 3) als intakter Superkomplex eluiert worden ist. Der Superkomplex $S_{\text{groß}}$ aus *E. gracilis* in Spur (4) ist etwa zur Hälfte in den kleineren zerfallen (ähnliche Anteile an $S_{\text{groß}}$ und S_{klein} in Spur (4) des Coomassie gefärbten Gels). Bei den aus *C. reinhardtii* eluierten Komplexen ist sogar ein Zerfall in das Monomer von Komplex I zu beobachten. Es bleibt also fraglich ob die erhöhte Coomassie-Konzentration nach Elution aus dem präparativen BN-Gel in Abbildung 5.35 nicht eher eine untergeordnete Rolle bezüglich der partiellen Dissoziation des Superkomplexes S2 aus *C. reinhardtii* spielt. Zusätzlich erkennt man in Spur 2 des Coomassie gefärbten hrCN-Gels eine Bande, die keine Komplex-I-Aktivität aufweist und eher dem mitochondrialen Dimer der ATP-Synthase zugeordnet werden kann (rote Pfeile in Abbildung 5.38). Außerdem scheint trotz der Konzentrierung der Proben nach der Elution die Proteinkonzentration relativ niedrig zu sein, da die Banden im Coomassie gefärbten Gel nicht sehr intensiv sind.

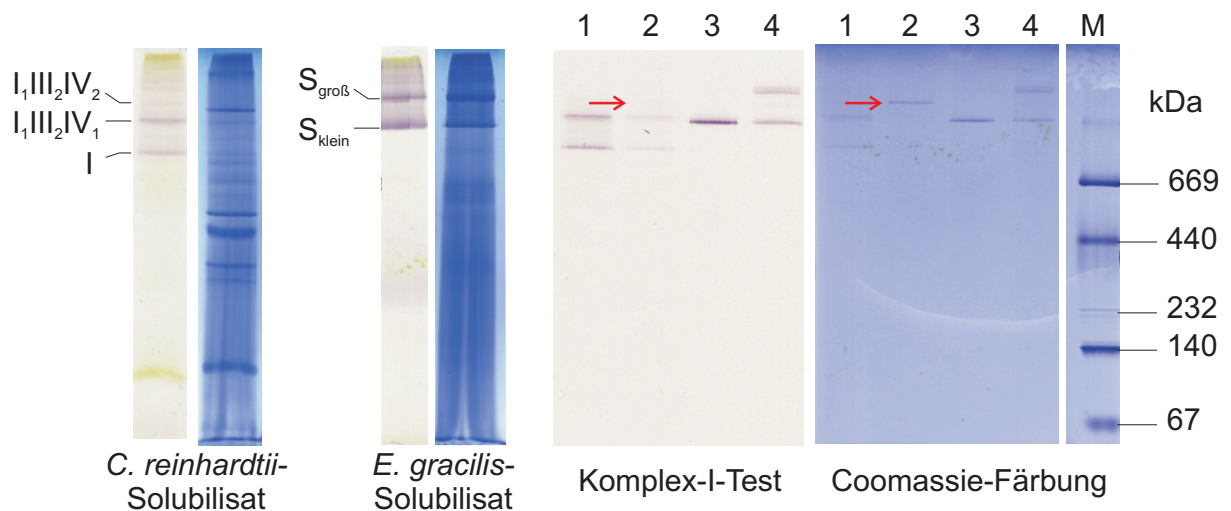


Abbildung 5.38: hrCN-PAGE eluierter Komplex-I-enthaltender Superkomplexe aus *C. reinhardtii* und *E. gracilis*-Mitochondrien. Dem Kathodenpuffer werden 0,05 % (w/v) DOC sowie 0,02 % (w/v) DDM zugesetzt. Links sind je zwei Spuren mit *C. reinhardtii*- bzw. *E. gracilis*-Solubilisat gezeigt, die zum einen Coomassie gefärbt und zum anderen auf Komplex-I-Aktivität getestet werden. Rechts im Bild sind die eluierten und konzentrierten Komplex-I-enthaltenden Superkomplexe aufgetragen (jeweils 10 μ L). In den Spuren (1) und (2) die Superkomplexe S1 und S2 aus *C. reinhardtii*, in den Spuren (3) und (4) die Superkomplexe S_{klein} und $S_{\text{groß}}$ aus *E. gracilis*. Nur S_{klein} ist intakt eluiert worden, alle anderen Superkomplexe zerfielen in den jeweils kleineren bzw. in das Monomer aus Komplex I. In Spur (2) wird eine Bande durch Coomassie gefärbt, die keine Komplex-I-Aktivität aufweist (rote Pfeile). Hierbei könnte es sich um V_2 handeln. Die mit (M) bezeichnete Spur enthält den Proteinstandard HMW.

Es ist nicht auszuschließen, dass der partielle Zerfall des Superkomplexes S2 aus *C. reinhardtii* während der Elution darauf zurückzuführen ist, dass die für die Solubilisierung verwendeten Mitochondrien bereits 2–3 Wochen bei -80°C gelagert wurden. Aus diesem Grund erfolgt eine Solubilisierung eines Organellengemischs aus *C. reinhardtii*, das frisch am gleichen Tag isoliert worden ist. Nach dem mechanischen Aufschluss der Zellen werden in einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei $150 \times g$ Zelltrümmer abgetrennt und die Organellen 1 h bei $10000 \times g$

sedimentiert. Nach Solubilisierung der frisch isolierten Probe ($25 \text{ g Digitonin g}^{-1} \text{ Chlorophyll}$, Chlorophyllkonzentration $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$) erfolgt die gelelektrophoretische Auftrennung mittels präparativer CN-PAGE ($18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke $5,8 \text{ mm}$). Auch hier wird die Elektrophorese nach etwa $\frac{2}{3}$ der Zeit gestoppt und Komplex-I-enthaltende Proteinbanden ausgeschnitten und eluiert. Die hierzu in Komplex-I-Testpuffer inkubierten Referenzstreifen wiesen zwar NADH-Dehydrogenase-Aktivität auf, jedoch bildeten sich keine scharfen Banden aus, was das exakte Ausschneiden der Proteinbanden im CN-Gel erschwerte. Abbildung 5.39 zeigt die per BN-PAGE analysierten, eluierten und konzentrierten Proteinkomplexe der frisch präparierten und solubilisierten Organellen aus *C. reinhardtii*. Es zeigt sich, dass auch nach frischer Präparation und Solubilisierung des *C. reinhardtii*-Organellengemischs eine Dissoziation der Superkomplexe während der Diffusionselution geschieht. Die Spuren (1) und (2) wurden mit dem aus beiden CN-Gelen eluierten Superkomplex S1 beladen, die Spuren (3) und (4) mit Superkomplex S2. Lediglich in den Spuren (3) und (4) links in Abbildung 5.39 erkennt man Banden mit Komplex-I-Aktivität. Eine sehr schwach gefärbte Bande ist hierbei auf den Superkomplex S1 zurückzuführen (roter Pfeil), die andere intensiver gefärbte Bande auf das Monomer von Komplex I. Diese Banden können ebenfalls im Coomassie gefärbten Teil des Gels gefunden werden. Zusätzlich zeichnen sich allerdings vor allem in den Spuren (1) und (2) weitere Banden ab (siehe rote Pfeile rechts in Abbildung 5.39). Hierbei könnte es sich um III_2IV_1 bzw. dimere Formen von Komplex III und IV handeln, die aus dem dissoziierten Superkomplex S1 stammen.

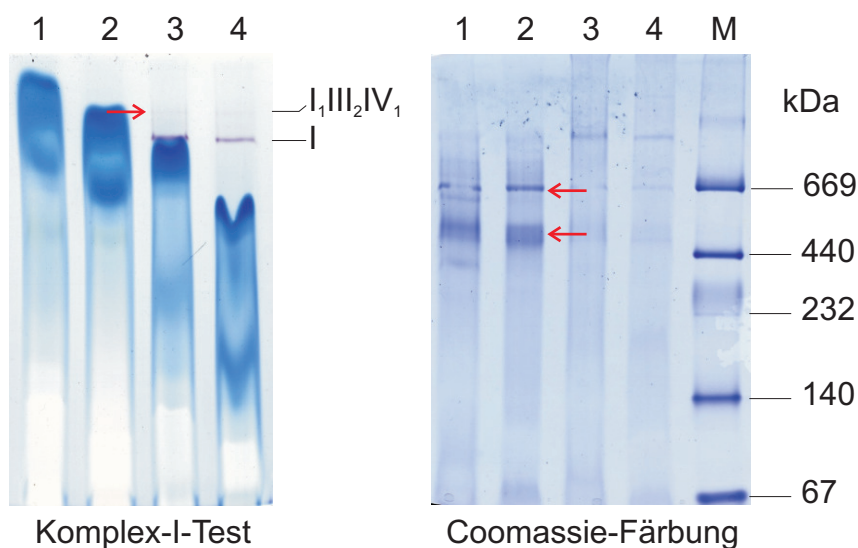


Abbildung 5.39: Eluierte und per BN-PAGE analysierte Komplex-I-enthaltende Superkomplexe aus frisch präparierten und solubilisierten Organellen aus *C. reinhardtii*. Die Elution erfolgt per Diffusion aus zwei identisch beladenen präparativen CN-Gelen ($18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke $5,8 \text{ mm}$). Die Spuren (1) und (2) sind mit dem kleineren, eluierten Superkomplex S1 der jeweiligen präparativen CN-Gele beladen, die Spuren (3) und (4) mit S2. Ein Teil des BN-Gels wird Coomassie gefärbt, der andere in Komplex-I-Testpuffer inkubiert. Der rote Pfeil links weist auf die nach Inkubation in Komplex-I-Testpuffer schwach gefärbte Superkomplexbande S1 hin, die beiden roten Pfeile rechts auf Zerfallsprodukte aus S1 wie III_2IV_1 sowie III_2 und IV_2 .

Wie die Ergebnisse der per Diffusion eluierten Superkomplexe zeigen, muss die Dissoziation der Proteinkomplexe während der Elution an sich passieren, unabhängig davon ob die primäre

Auftrennung per BN- oder CN-PAGE durchgeführt wird. Auch ist kein Unterschied erkennbar, wenn zur Solubilisierung Mitochondrien verwendet werden, die mehrere Wochen bei -80°C gelagert oder frisch isoliert worden sind. Um zu überprüfen, ob eine Reduzierung der Gel-dicke einen positiven Einfluss auf die Bandenschärfe der zu eluierenden Superkomplexe hat, werden je vier 1,5 mm dicke CN- und BN-Gele (15 Taschen) mit Solubilisat eines *C. reinhardtii*-Organellengemischs beladen. Die Solubilisierung wird mit 1,5 % (w/v) Digitonin durchgeführt und der Ansatz auf eine Chlorophyll-Endkonzentration von $0,25\text{ mg mL}^{-1}$ verdünnt. Pro Gel-tasche wird ein Volumen von 80 μL aufgetragen, das einer Masse bezogen auf Chlorophyll von 20 μg pro Tasche entspricht. Insgesamt ist die aufgetragene Masse somit vergleichbar mit der auf ein dickes präparatives Gel aufgetragenen. In Abbildung 5.40 sind jeweils die Coomassie gefärbten bzw. in Komplex-I-Testpuffer inkubierten Referenzstreifen eines CN- und BN-Gels gezeigt. Im CN-Gel sind trotz der Reduzierung der Geldicke die Komplex-I-aktiven Banden wieder nur sehr diffus zu erkennen. Im BN-Gel zeichnen sich die Banden zwar schärfer ab, aber Superkomplex S2 ist im mit Komplex-I-Aktivitätstestpuffer inkubierten Streifen nicht zu finden. Man erkennt lediglich S1 und das Monomer von Komplex I. Aus beiden Geltypen werden die Komplex-I-aktiven Banden ausgeschnitten und per Diffusion eluiert. Aus den CN-Gelen werden jeweils identische Eluate aus zwei Gelen vereint. Aus dem BN-Gel erfolgt zusätzlich die Elution des ATP-Synthase-Dimers V_2 .

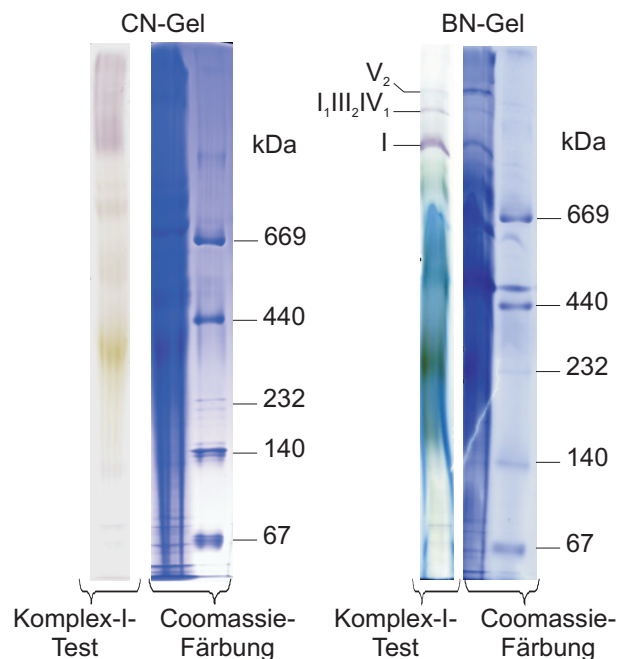


Abbildung 5.40: 1,5 mm dicke Referenzstreifen eines CN- und BN-Gels mit solubilisierten Organellen aus *C. reinhardtii*. Coomassie gefärbt wird je ein Teil des aufgetragenen Solubilisates sowie der Proteinmarker (HMW). Je eine Spur wird auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht. Die Komplex-I-aktiven Banden aus beiden Gelsystemen werden eluiert sowie das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase aus dem BN-Gel.

Die erhaltenen Konzentrate aus den CN- und BN-Gelen werden per Mini-BN-PAGE untersucht (Abbildung 5.41). Auf Grund der schwierigen Zuordnung von diskreten Banden im Referenzstreifen des CN-Gels (links in Abbildung 5.40) sind offensichtlich wieder mehr Banden aus-

geschnitten und eluiert worden als erwünscht. Die Spuren (1) und (2) werden jeweils mit den konzentrierten Eluaten des Komplex-I-Monomers aus zwei CN-Gelen beladen (Abbildung 5.41). Komplex-I-Aktivität kann zwar auch festgestellt werden, allerdings weist die Anwesenheit anderer Proteinkomplexe darauf hin, dass eventuell Superkomplex S1 ebenfalls ausgeschnitten und eluiert worden ist, während der Diffusionselution aber wieder in kleinere Komplexe dissoziierte. Gleiches gilt für das in den Spuren (3) und (4) aufgetragene Eluat. Hier wird ebenfalls für das Monomer der NADH-Dehydrogenase Komplex-I-Aktivität festgestellt, aber neben Banden, die aus Zerfallsprodukten eines Komplex-I-enthaltenden Superkomplexes stammen könnten, zeichnet sich auch deutlich die Bande für das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase ab (V_2).

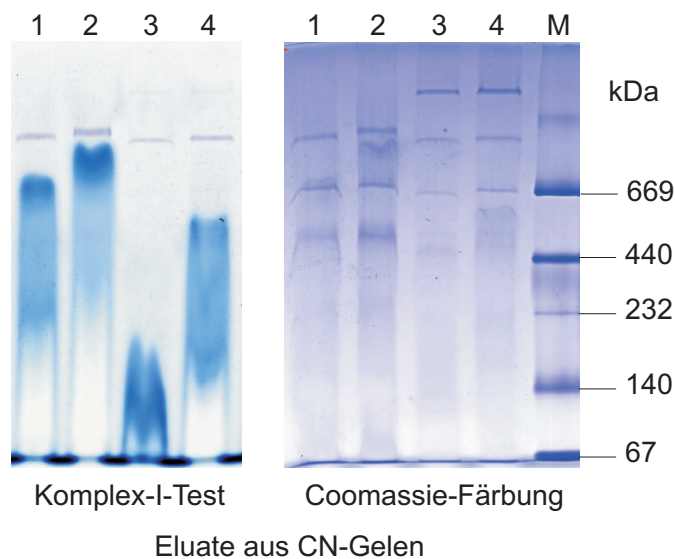


Abbildung 5.41: BN-PAGE konzentrierter Superkomplex-Eluate aus *C. reinhardtii*-Organellen. Die Diffusionselution erfolgt aus vier 1,5 mm dicken CN-Gelen. Die Spuren (1) und (2) enthalten je das aus zwei CN-Gelen eluierte und vereinte Monomer von Komplex I. Die Spuren (3) und (4) werden je mit den eluierten und aus zwei CN-Gelen vereinten Komplex-I-enthaltenden Superkomplexen beladen. Ein Teil des Gels wird Coomassie gefärbt, der andere auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht. Die mit (M) bezeichnete Spur enthält den Proteinstandard HMW.

Die Spuren (1) und (2) in Abbildung 5.42 werden mit aus den BN-Gelen eluiertem Monomer der NADH-Dehydrogenase bzw. eluiertem Superkomplex S1 beladen (je 20 μ L). In beiden Spuren kann Komplex-I-Aktivität festgestellt werden, die allerdings in beiden Fällen auf das Komplex-I-Monomer zurückzuführen ist. Der Coomassie gefärbte Teil des Gels zeigt außerdem, dass zum einen die Konzentrationen der Eluate sehr gering zu sein scheinen, zum anderen dass auch hier wieder mehrere Banden zu sehen sind, die für eine Dissoziation des Superkomplexes S1 sprechen. Das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase dagegen scheint erfolgreich isoliert worden zu sein, da in dieser Spur keine Komplex-I-Aktivität verzeichnet werden kann. Auch das Coomassie gefärbte Gel zeigt neben V_2 nur eine schwache Bande auf Höhe der 669 kDa Markerbande, die auf einen geringfügigen Zerfall des ATP-Synthase-Dimers in F_0F_1 hinweist. Allerdings können diese beiden Banden, im Unterschied zum Solubilisat, mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit der CF_0F_1 aus Spinat nicht detektiert werden (siehe rote Pfeile in Abbildung 5.42).

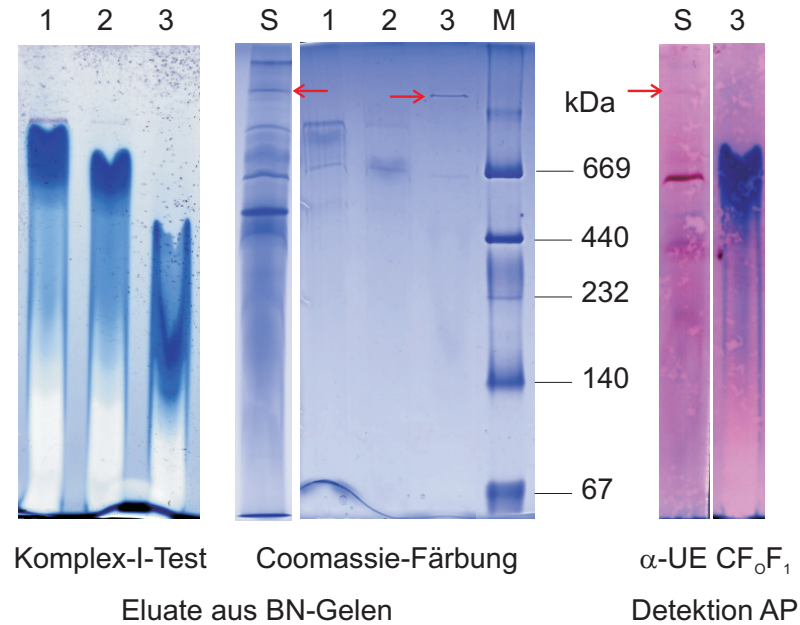


Abbildung 5.42: BN-PAGE konzentrierter Protein(sup)komplex-Eluate aus *C. reinhardtii*-Organellen. Die Elution erfolgt aus vier 1,5 mm dicken BN-Gelen. Die Spuren (1) und (2) werden mit dem eluierten Monomer von Komplex I bzw. dem Superkomplex S1 beladen. Spur (3) enthält das eluierte Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase. Zusätzlich zu den Eluaten wird auch das *C. reinhardtii*-Organellensolubilisat aufgetragen (S). Ein Teil des Gels wird mit Coomassie gefärbt (Mitte) und ein Teil in Komplex-I-Aktivitätstestpuffer inkubiert (links). Sowohl eine Gelspur mit Solubilisat (S), als auch eine Spur mit eluiertem ATP-Synthase-Dimer (3) werden geblottet und mit Antikörpern gegen die α -Untereinheit der CF₀F₁ aus Spinat markiert (rechts). Die Detektion der markierten Proteine erfolgt mit AP. Die mit (M) bezeichnete Spur enthält den Proteinstandard HMW. Die roten Pfeile deuten auf V₂-Banden hin.

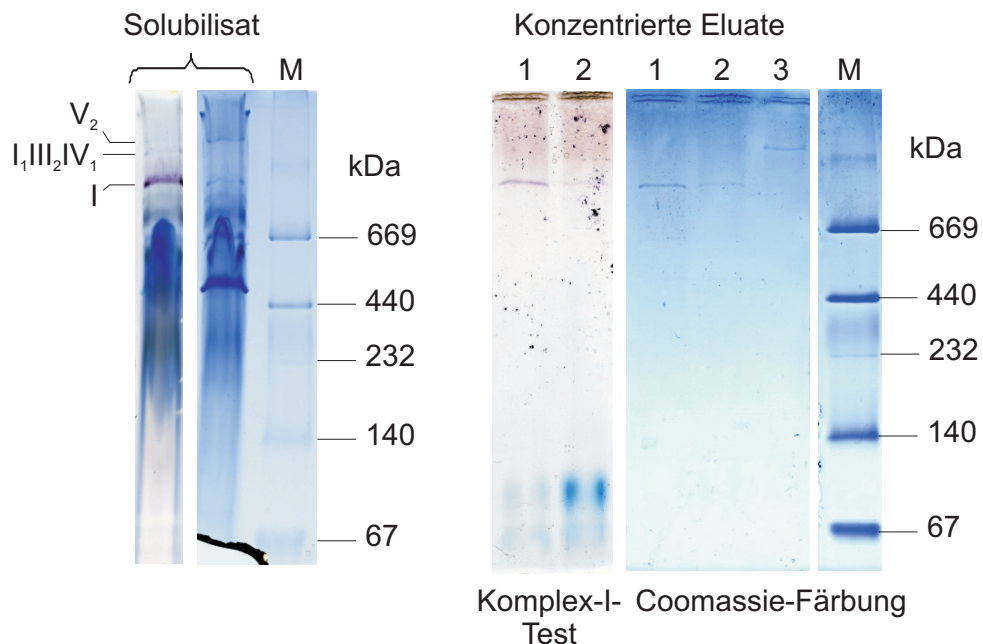


Abbildung 5.43: Die Diffusionselution von Protein(sup)komplexen aus kleinen BN-Gelen (links) findet hier unter Zugabe von je 0,1 mg mL⁻¹ L- α -Phosphatidylcholin und Cardiolipin zum Elutionspuffer statt. Die eluierten Komplexe NADH-Dehydrogenase (1), S1 (2) und V₂ (3) stammen aus solubilisierten *C. reinhardtii*-Organellen. Die per BN-PAGE analysierten Eluate rechts werden Coomassie gefärbt bzw. in Komplex-I-Testpuffer inkubiert. Die mit (M) bezeichneten Spuren enthalten den Proteinstandard HMW.

Um die offensichtliche Dissoziation von mitochondrialen Superkomplexen während der Diffusionselution zu reduzieren, wird dem Elutionspuffer zusätzlich zu 0,1 % (w/v) Digitonin zur Stabilisierung von Superkomplexen jeweils 0,1 mg mL⁻¹ L- α -Phosphatidylcholin und Cardiolipin zugesetzt. Cardiolipin liegt mit einer Konzentration von 1 mg mL⁻¹ gelöst in Chloroform vor. 5 mL dieser Stammlösung werden in einen 50 mL Rundkolben pipettiert und dazu 5 mg L- α -Phosphatidylcholin eingewogen. Das Lösemittel wird unter Stickstoff als Schutzgas am Rotationsverdampfer bei einem Enddruck von etwa 50 mbar abgezogen. Nach Entfernung des Lösemittels versetzt man die Lipidmischung im Rundkolben mit 500 μ L Diffusionselutionspuffer (100x, Zusammensetzung siehe Tabelle 4.50 auf Seite 70), 500 μ L Digitonin (10 % (w/v)) und füllt mit bidest. H₂O auf 50 mL auf, um die gewünschten Konzentrationen der Komponenten zu erhalten. Für die Diffusionselution mit Lipidzusatz im Elutionspuffer wird wieder ein Organellengemisch aus *C. reinhardtii* unter den gleichen Bedingungen wie zuvor solubilisiert (1,5 % (w/v) Digitonin, Chlorophyllkonzentration 0,25 mg mL⁻¹). Das Solubilisat wird diesmal auf drei kleine BN-Gele geladen und hieraus eluiert. Die Analyse der konzentrierten Eluate in Abbildung 5.43 zeigt, dass die Lipidzugabe zum Elutionspuffer in diesem Fall die Stabilität des Superkomplexes S1 nicht erhöht hat. Auch hier stellt man lediglich Komplex-I-Aktivität bezüglich des Monomers der NADH-Dehydrogenase fest. In Spur (3) rechts in Abbildung 5.43 erkennt man eine schwach gefärbte Bande, die auf das mitochondriale Dimer der ATP-Synthase zurückzuführen ist. Obwohl die Eluate per Ultrafiltration konzentriert werden, erfolgt nur eine sehr schwache Färbung der Banden im BN-Gel. Diese Tatsache ist darauf zurückzuführen, dass die hier auf kleine BN-Gele aufgetragene Menge an Solubilisat deutlich geringer ist, als im Falle von präparativen 18,0 \times 16,0 cm² großen nativen Gelen. Die Elution erfolgte hier aus kleinen BN-Gelen, um zu überprüfen, ob die Zugabe der Lipide L- α -Phosphatidylcholin und Cardiolipin zum Elutionspuffer einen stabilisierenden Einfluss auf Superkomplexe während der Elution hat. Ein Stabilisierungseffekt konnte hier nicht beobachtet werden.

Offensichtlich scheint es sehr schwierig zu sein, Superkomplexe aus *C. reinhardtii* intakt per Diffusionselution zu isolieren. Selbst nach Elution aus CN-Gelen, die für Proteinkomplexe mildeste Art der nativen Elektrophorese, gelingt es nicht die Superkomplexe S1 und S2 intakt zu isolieren. Die Durchführung der sanften CN-PAGE bringt aber auch einen großen Nachteil mit sich. Im Unterschied zur BN-PAGE ist das Auffinden von Proteinbanden hier deutlich erschwert. Es ist nötig, die interessierenden Proteinkomplexe in Referenzstreifen sichtbar zu machen, um die Banden im CN-Gel lokalisieren zu können. Wie gezeigt werden konnte, führt diese Methode dazu, dass Proteinbanden nur ungenau ausgeschnitten werden können und unerwünschte Mischungen von Proteinkomplexen eluiert werden. Des Weiteren ist nicht gewährleistet, dass wie bei der Elution der Spinat-CF₀F₁ auch für mitochondriale Superkomplexe die Diffusionselution die schonendere Variante darstellt. In Abschnitt 5.4.2 werden die Ergebnisse von per Elektroelution durchgeführten Proteinisolierungen vorgestellt und diskutiert.

5.4.2 Elektroelution

Im Vergleich zur Elution von Superkomplexen aus *C. reinhardtii* konnten entsprechende *E. gracilis*-Superkomplexe relativ gut aus präparativen CN-Gelen per Diffusion eluiert werden (siehe Abbildung 5.38). Aus diesem Grund wird versucht, ob die Isolierung dieser Superkomplexe aus präparativen BN-Gelen (Dicke 1,5 mm, $18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$) per Elektroelution gelingt. Hierzu werden *E. gracilis*-Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und 2 mL Solubilisat gelelektrophoretisch getrennt ($25 \text{ g Detergens g}^{-1}$ Chlorophyll, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ Chlorophyllkonzentration). Nach Inkubation dieses Streifens in Komplex-I-Testpuffer können die entsprechenden Komplex-I-aktiven Banden im BN-Gel lokalisiert werden. Es wird hier die auch im BN-Gel intensiv gefärbte Bande ausgeschnitten, die auf etwa der gleichen Höhe läuft wie $I_1III_2IV_3$ aus BHM (siehe Abbildung 5.44). Diese Bande wird zerkleinert und entsprechend der Durchführung in Abschnitt 4.11.2 über Nacht elektroeluiert (75 V, 2 mA pro Elutionszelle). Anders als im Methodenteil beschrieben wird dem Elutionspuffer hier kein Digitonin zugesetzt. Dieses soll zwar Proteinsuperkomplexe während der Elution stabilisieren, würde aber beispielsweise für elektronenmikroskopische Anwendungen stören.

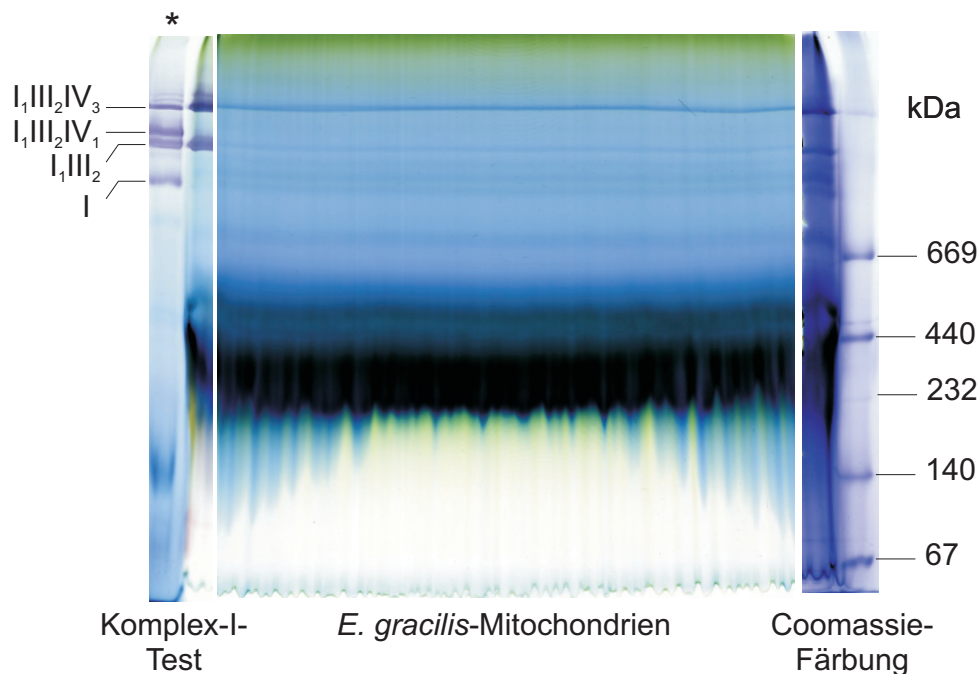


Abbildung 5.44: Präparatives BN-Gel (Dicke 1,5 mm, $18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$) das mit solubilisierten Mitochondrien aus *E. gracilis* ($25 \text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ Chlorophyllkonzentration) beladen worden ist. Neben dem HMW-Proteinmarker wird eine Referenzspur mit $14 \mu\text{g}$ BHM beladen (links *), die nach der Elektrophorese zusammen mit einer schmalen *E. gracilis*-Spur auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht wird. Zur Elektroelution wird die intensiv gefärbte Bande ausgeschnitten, die auf gleicher Höhe von $I_1III_2IV_3$ aus BHM läuft.

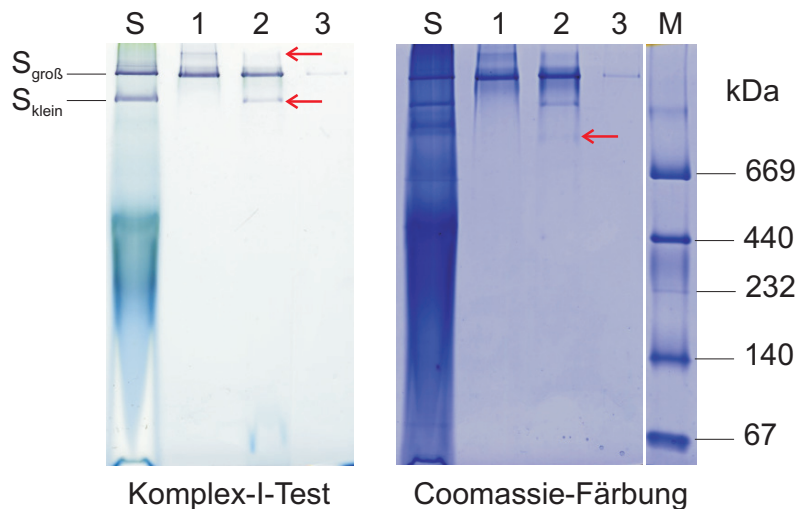


Abbildung 5.45: Gelelektrophoretische Untersuchung des per Elektroelution erhaltenen Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ aus dem mit solubilierten *E. gracilis*-Mitochondrien beladenen präparativen BN-Gel (siehe Abbildung 5.44). Je 35 μL des ohne (1) bzw. mit (2) 0,2 % (w/v) Digitonin versetzten Elektroeluates werden aufgetragen. Zusätzlich ist das BN-Gel mit 20 μL des Solubilisats (S) sowie 35 μL des aufbewahrten Überstandes (3) aus der Elektroelutionskammer beladen worden. In Spur (1) links ist ein hochmolekularer Superkomplex zu erkennen, der in Spur (2) teilweise zu Superkomplex S_{klein} zerfallen ist (rote Pfeile links). Der rote Pfeil rechts deutet auf ein weiteres Zerfallsprodukt aus *E. gracilis*-Superkomplexen. Die mit (M) bezeichnete Spur enthält den Proteinstandard HMW.

Der farblose Überstand in der Elektroelutionszelle wird bis auf ein Restvolumen von ca. 300 μL abgenommen und ein Teil zur Analyse aufbewahrt. Das Restvolumen wird zur Resuspension des tief blau gefärbten, auf der Membran konzentrierten Elektroeluates (EE) verwendet. Um zu überprüfen, ob das Fehlen von Digitonin einen negativen Einfluss auf die Stabilität des elektroeluierten Superkomplexes hat, bleibt der größte Teil der Probe unbehandelt und nur etwa ein Drittel des erhaltenen Gesamtvolumens wird mit 0,2 % (w/v) Digitonin versetzt. In Abbildung 5.45 ist das Ergebnis des per BN-PAGE analysierten Elektroeluates gezeigt. Man sieht deutlich, dass die Elektroelution des Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ aus *E. gracilis*-Mitochondrien erfolgreich war. Es lässt sich aber auch zeigen, dass die Zugabe von Digitonin zum Eluat nach der Elution einen Einfluss hat. In Spur (1) ist das Eluat ohne die Zugabe des Detergens aufgetragen. Neben der intensiv gefärbten Bande $S_{\text{groß}}$ erkennt man eine schmale Bande oberhalb dieser (oberer roter Pfeil links in Abbildung 5.45). In der mit Digitonin versetzten Probe in Spur (2) findet man diese hochmolekulare Bande nicht mehr. Dafür erscheint eine Komplex-I-aktive Bande auf Höhe von S_{klein} . Es scheint somit eine teilweise Dissoziation von Superkomplexen auf Grund des Digitonins gegeben zu haben. Es ist allerdings schwierig herauszufinden, ob die Dissoziation allein auf die mit dem Pfeil markierte obere Bande beschränkt ist, oder ob auch ein Teil von $S_{\text{groß}}$ zerfallen ist. Im Coomassie gefärbten Teil des Gels erkennt man in Spur (2) eine sehr schwach gefärbte Bande, die auf Grund der Masse von etwa 1000 kDa auf das Monomer von Komplex I hinweist (siehe roter Pfeil rechts in Abbildung 5.45). Diese Bande erscheint in Spur (1) nicht. Im Überstand (Spur (3)) kann zwar auch noch eluierter Superkomplex gefunden werden, die

sehr schwachen Färbungen in beiden Gelteilen sprechen aber dafür, dass die Konzentration des Superkomplexes hier vernachlässigbar gering ist.

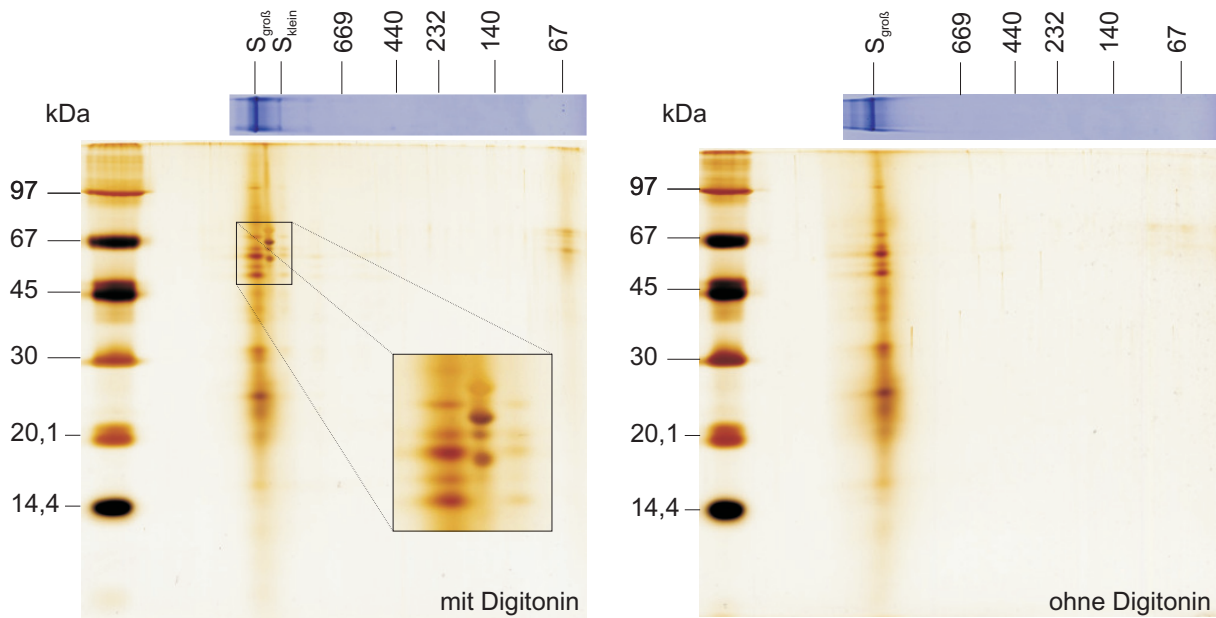


Abbildung 5.46: 2D-Tricin-SDS-PAGE des elektroeluierten Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ (siehe Abbildung 5.45) mit und ohne Digitonin-Zugabe (links bzw. rechts) nach der Elution. Die Gelstreifen der ersten nativen Dimension werden zur Denaturierung 1 h bei ZT mit einer Lösung aus 1 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Zur Sichtbarmachung der Proteinspots auf den Gelen werden diese Silber gefärbt.

Noch deutlicher als in Abbildung 5.45 kann hier der negative Einfluss des Digitonins in der zweiten denaturierenden Dimension gezeigt werden. Hierzu werden zwei BN-Gelstreifen des mit und ohne Digitonin-Zugabe elektroeluierten Superkomplexes 1 h bei ZT mit einer Mischung aus 1 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol denaturiert und per 2D-Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 5.46). In beiden Gelen ist eine große Anzahl an Proteinuntereinheiten zu sehen, die aus dem eluierten Superkomplex $S_{\text{groß}}$ stammen. Ohne die nachträgliche Detergenzugabe zum konzentrierten Eluat ist im Unterschied zum mit Digitonin versetzten Eluat kein teilweiser Zerfall von Superkomplexen zu beobachten. Bei Betrachtung des vergrößerten Ausschnitts links in Abbildung 5.46 erkennt man Proteinspots des eluierten Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ sowie schwächer gefärbte Untereinheiten von S_{klein} , der aus dem Zerfall größerer Superkomplexe resultiert. Dazwischen zeichnen sich zusätzlich mindestens vier Spots ab, die auf Grund ihrer Lage nicht aus einem Komplex-I-aktiven Superkomplex stammen können. Hierbei könnte es sich um teilweise Zerfallsprodukte des bereits erwähnten Photosystemsuperkomplexes handeln, der im BN-Gel auf gleicher Höhe wie $S_{\text{groß}}$ migriert (siehe Abbildung 5.29 auf Seite 107).

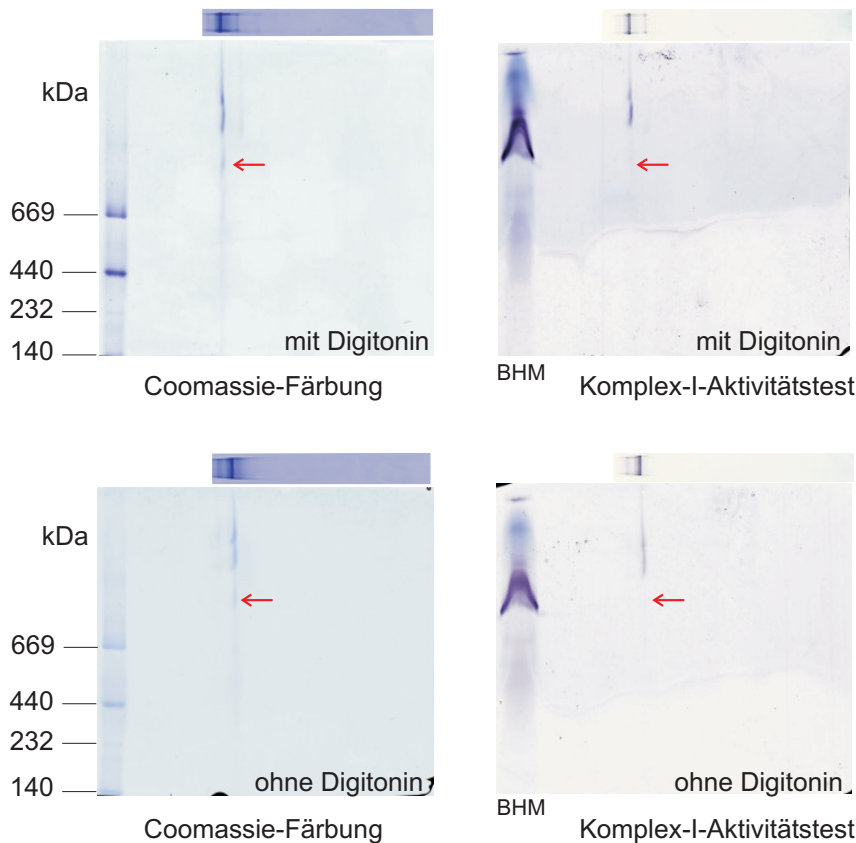


Abbildung 5.47: 2D-BN-PAGE des elektroeluierten Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ mit (oben) und ohne (unten) Digitonin-Zugabe nach der Elution. Die Gelstreifen der ersten nativen Dimension werden unter Zugabe von 0,02 % (w/v) DDM zum B/10-Kathodenpuffer in der zweiten nativen Dimension aufgetrennt. Die Gele werden Coomassie gefärbt (links) und in Komplex-I-Aktivitätstestlösung (rechts) inkubiert. Die für den Komplex-I-Test verwendeten Gele werden mit einer Referenzspur solubilisierter BHM beladen (10 μg). Die roten Pfeile weisen auf aufgetrennte Proteinkomplexe hin, die keine Komplex-I-Aktivität zeigen.

Neben Analysen unter denaturierenden Bedingungen wird das Eluat auch per 2D-BN-PAGE untersucht (Abbildung 5.47). Durch Zugabe von 0,02 % (w/v) DDM zum B/10-Kathodenpuffer erreicht man einen teilweisen Zerfall von Superkomplexen in die entsprechenden Proteinkomplexe, die weiterhin Enzymaktivität aufweisen. Alle Proteinkomplexe, die keine Veränderung durch das zugesetzte Detergens erfahren, verlaufen in der zweiten Dimension auf einer Diagonalen, alle anderen unterhalb dieser. Bei nur wenigen Banden im Gelstreifen der ersten Dimension, wie hier in Abbildung 5.47, ist diese Diagonale nicht wirklich zu erkennen. Aber der teilweise, detergensbedingte Zerfall der eluierten Superkomplexe ist hier trotzdem erkennbar. Vergleicht man die Coomassie gefärbten Gele mit den auf Komplex-I-Aktivität hin untersuchten, so zeigt sich, dass nur ein Teil der aufgetrennten Bande aktiven Komplex I enthält (siehe rote Pfeile in Abbildung 5.47). Eine genauere Zuordnung ist hier allerdings schwierig, da die als Referenz aufgetragenen solubilisierten BHM sehr verschmiert gelaufen sind.

Trotz der gelungenen Elution eines intakten Superkomplexes aus *E. gracilis*-Mitochondrien aus einem präparativen BN-Gel (1,5 mm) wird durch Erhöhung der Dicke eines präparativen BN-Gels auf 4 mm versucht, die Menge an eluiertem Superkomplex zu erhöhen. Dieses

dickere präparative BN-Gel wird mit 2,3 mL solubilisierten *E. gracilis*-Mitochondrien beladen ($0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ Chlorophyllkonzentration). Das Laufverhalten des Solubisates in diesem BN-Gel ist identisch mit dem des dünneren BN-Gels in Abbildung 5.44. Auch hier wird der Superkomplex $S_{\text{groß}}$, der auf Höhe von $I_1 III_2 IV_3$ aus BHM läuft, ausgeschnitten und über Nacht elektroeluiert (75 V, 2 mA pro Elutionszelle). Das erhaltene Eluat wird hier per Ultrafiltration weiter konzentriert (Roti[®]-Spin MINI 100, 10-minütige Zentrifugation bei $12000 \times g$ und 4°C). Abbildung 5.48 zeigt die per BN-PAGE analysierte konzentrierte Probe.

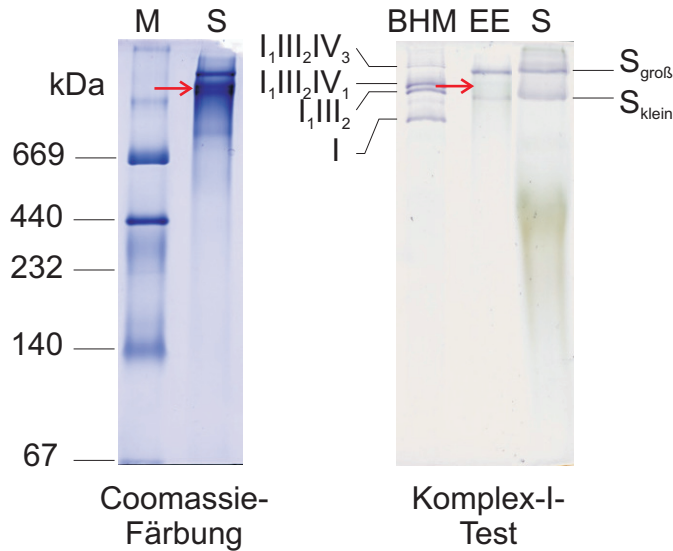


Abbildung 5.48: BN-PAGE des elektroeluierten Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ aus solubilisierten *E. gracilis*-Mitochondrien. Die Elution erfolgt aus einem präparativen 4 mm dicken BN-Gel. Der Teil des analytischen BN-Gels, der auf Komplex-I-Aktivität hin untersucht wird, enthält eine Referenzspur mit $10 \mu\text{g}$ solubilisierten BHM sowie zusätzlich zum Elektroeluat (EE) das Solubilisat (S). Ebenfalls erfolgt eine Coomassie-Färbung des anderen BN-Gelteils der mit Solubilisat (S) und dem Proteinstandard HMW (M) beladen worden ist. Die roten Pfeile weisen auf einen teilweise zerfallenen Proteinkomplex des Photosyntheseapparates hin.

Wie die Analyse des BN-Gels zeigt, konnte der Superkomplex $S_{\text{groß}}$ zwar eluiert werden, aber sowohl im Coomassie gefärbten Teil als auch im Gelteil nach Inkubation in Komplex-I-Testlösung sind weitere Banden zu erkennen. Sehr auffällig ist die mit einem roten Pfeil markierte Bande im Coomassie gefärbten Gel, die sich zwischen beiden *E. gracilis*-Superkomplexen befindet. Offensichtlich führte die Konzentrierung per Ultrafiltration dazu, dass zum einen der eluierte Superkomplex $S_{\text{groß}}$ durch partielle Dissoziation in den kleineren Superkomplex S_{klein} überführt wurde. Zum anderen scheint auch der bereits angesprochene Photosynthesesuperkomplex dissoziativ verkleinert worden zu sein, sodass zwischen beiden mitochondrialen Superkomplexen eine intensiv gefärbte Bande erscheint. Ein Indiz für diese Vermutung findet sich im rechten Teil von Abbildung 5.48 (Spur (EE)). Hier zeichnet sich die besagte Bande zwischen beiden Superkomplexen als grünliche Bande ab, was auf einen Proteinkomplex des Photosyntheseapparates zurückschließen lässt.

Hinsichtlich der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Diffusionselution von *E. gracilis*-Superkomplexen aus präparativen CN-Gelen (siehe Abbildung 5.38 auf Seite 117) wird ein

Versuch unternommen, den Superkomplex $S_{\text{gro\ss}}$ per Elektroelution aus einem präparativen CN-Gel zu isolieren. 1,5 mL solubilisierter *E. gracilis*-Mitochondrien (25 g Digitonin g^{-1} Chlorophyll, 0,4 mg mL^{-1} Chlorophyllkonzentration) werden per präparativer CN-PAGE aufgetrennt. Die Zuordnung der zu eluierenden Bande erfolgt wieder per Inkubation eines mit solubilisierten BHM beladenen Referenzstreifens in Komplex-I-Aktivitätstestpuffer.

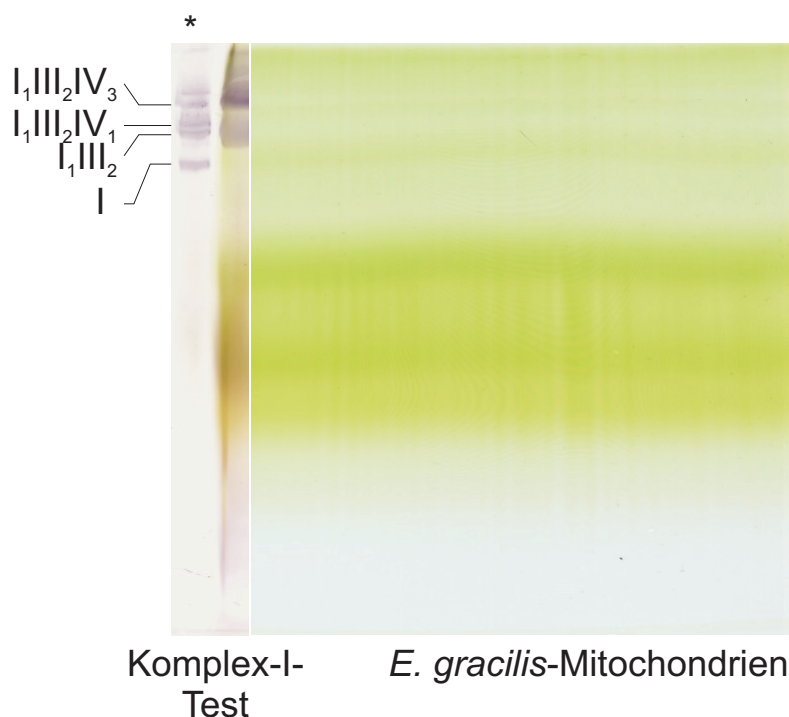


Abbildung 5.49: Präparatives CN-Gel (Dicke 1,5 mm) beladen mit 1,5 mL solubilisierter *E. gracilis*-Mitochondrien. Die Solubilisierung wird mit Digitonin (25 g Detergens g^{-1} Chlorophyll) bei einer Chlorophyllkonzentration von 0,4 mg mL^{-1} durchgeführt. Zur Lokalisierung von Superkomplexbanden im präparativen CN-Gel wird ein Referenzstreifen solubilisierter BHM (14 μg , links *) zusammen mit einem schmalen Streifen *E. gracilis*-Solubilisat in Komplex-I-Testlösung inkubiert. Anhand der Färbung wird zur Elution des Superkomplexes $S_{\text{gro\ss}}$ die relativ breite Bande auf Höhe von I₁III₂IV₃ aus BHM ausgestochen.

Zur Elution von Proteinkomplexen aus CN-Gelen ist es erforderlich das auf der anodenseitigen Membran konzentrierte Eluat mit 0,1 % (w/v) Digitonin zu versetzen. Anders als in BN-Gelen fehlt hier ein negativer Ladungsträger, der die Nettoladung der Proteine überdeckt und die Elektroelution somit erleichtert bzw. das auf der Membran konzentrierte Eluat stabilisiert. Während der Elektroelution kann vorhandenes Digitonin Protein(super)komplexe bei der Migration aus dem CN-Gel und durch die Pufferlösung stabilisieren. Wichtiger ist jedoch das Vorhandensein von Digitonin im konzentrierten Eluat, um eventuelle Aggregationen der Membranprotein-komplexe zu verhindern. Auch hier wird die EE über Nacht durchgeführt (75 V, 2 mA pro Elutionszelle, 4 °C). Nach Abnahme des überstehenden Elutionspuffers bis auf ein Restvolumen von ca. 400 μL wird das auf der Membran konzentrierte Eluat mit diesem Restvolumen vorsichtig resuspendiert und mit 0,1 % (w/v) Digitonin versetzt. Das Ergebnis der Analyse des Elektroeluates per BN-PAGE ist in Abbildung 5.50 gezeigt.

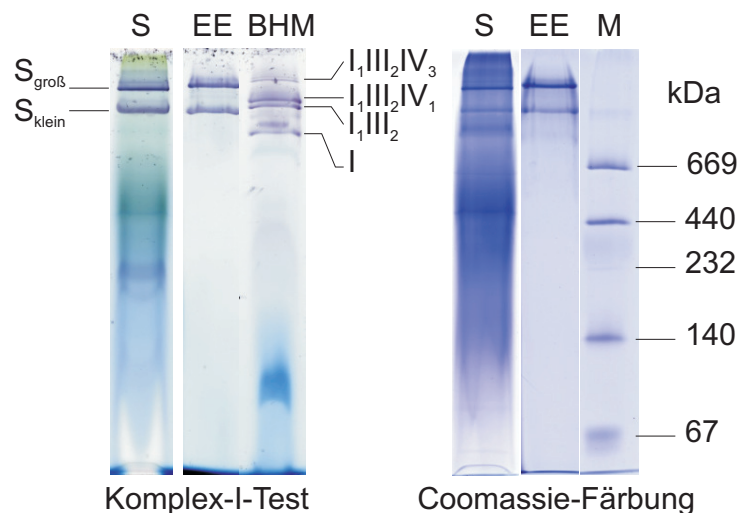


Abbildung 5.50: Analytisches BN-Gel des erhaltenen und konzentrierten Elektroeluates (EE) aus einem präparativen CN-Gel (Abbildung 5.49, Dicke 1,5 mm). Zusätzlich zum EE wird das Solubilisat (S) aus *E. gracilis*-Mitochondrien sowie für den Test auf Komplex-I-Aktivität BHM-Solubilisat aufgetragen. Ein Teil des analytischen BN-Gels wird Coomassie gefärbt. Die mit (M) bezeichnete Spur enthält den Proteinstandard HMW.

Wie das analytische BN-Gel mit der elektroeluierten Probe zeigt, ist zusätzlich zum Superkomplex $S_{\text{groß}}$ eine weitere Komplex-I-aktive Bande mit geringerer Masse erkennbar. Es besteht die Möglichkeit, dass im präparativen CN-Gel nicht nur die Bande des größeren Superkomplexes ausgeschnitten worden ist, sondern auch ein Teil des Superkomplexes S_{klein} . Wie in Abbildung 5.49 zu sehen ist, erstreckt sich die auf aktiven Komplex I zurückzuführende Färbung des kleineren Superkomplexes über einen relativ breiten Bereich, sodass ein irrtümliches Ausschneiden von Teilen dieser Bande wahrscheinlich ist. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass während der Elektroelution des ausgeschnittenen Superkomplexes, trotz Stabilisierung durch 0,1 % (w/v) Digitonin im Elutionspuffer, ein teilweiser Zerfall des größeren Superkomplexes in den kleineren erfolgt ist.

Für alle bisherigen Solubilisierungen von Organellenmembranen wurden die in Abschnitt 4.3.1 beschriebenen Solubilisierungspuffer verwendet (Seite 33). Da eine effiziente Solubilisierung von essenzieller Bedeutung für alle sich daran anschließenden Analysen ist, muss überprüft werden, inwiefern eine Veränderung des Solubilisierungspuffers Einfluss auf die Solubilisierung hat. Aus diesem Grund wird für eine zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführte Elektroelution eines Superkomplexes aus *E. gracilis*-Mitochondrien nicht der übliche Solubilisierungspuffer (Tabelle 4.13) verwendet, sondern ein Puffer der zur Solubilisierung von BHM^[105] eingesetzt wird. Die Zusammensetzung dieses Puffers ist in Tabelle 5.5 dargestellt. Die Durchführung der Solubilisierung erfolgt bis auf die Verwendung des BHM-Solubilisierungspuffers unverändert. 1,5 mL des Solubisates (0,4 mg mL⁻¹ Chlorophyllkonzentration, 25 g Digitonin g⁻¹ Chlorophyll) werden auf ein 1,5 mm dickes präparatives BN-Gel aufgetragen. Die Dauer der Elektrophorese ist hier mit etwa 5 h um ca. 1,5 h länger als bei Verwendung des üblichen Solubilisierungspuffers. Wie in zuvor durchgeführten Elektroelutionen wird zur Lokalisierung der Superkomplexbande

$S_{\text{groß}}$ ein schmaler Streifen des präparativen BN-Gels in Komplex-I-Testpuffer inkubiert. Der ün elektroeluierte Superkomplex wird per BN-PAGE analysiert.

Tabelle 5.5: Solubilisierungspuffer (2x) für Rinderherzmitochondrien (BHM) ^[105].

Solubilisierungspuffer (2x) für BHM	
$6 \cdot 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$	HEPES
$0,3 \text{ mol L}^{-1}$	Kaliumacetat
20 % (w/v)	Glycerin
pH 7,4	mit HCl einstellen

Auf eine Darstellung des präparativen BN-Gels verzichte ich hier, da die geringfügigen Unterschiede bezüglich des Laufverhaltens beider Solubilisate (normaler Solubilisierungspuffer und BHM-Solubilisierungspuffer) vergleichend in einem analytischen BN-Gel gezeigt werden. Abbildung 5.51 zeigt das analytische BN-Gel, das zusätzlich zum Elektroeluat (Spur (2)) mit den unterschiedlichen Solubilisaten beladen worden ist (normaler Solubilisierungspuffer in Spur (3), BHM-Solubilisierungspuffer in Spur (1)). Zwar sieht man in Abbildung 5.51, dass $S_{\text{groß}}$ mit aktivem Komplex I eluiert werden konnte, neben diesem aber auch eine Bande vorliegt, die auf den Superkomplex S_{klein} zurückzuführen ist. Der Anteil an zerfallenem Superkomplex scheint jedoch geringer zu sein als das nach Konzentrierung des Eluats per Ultrafiltration bzw. nach Elution aus einem präparativen CN-Gel der Fall war (siehe Abbildungen 5.48 und 5.50).

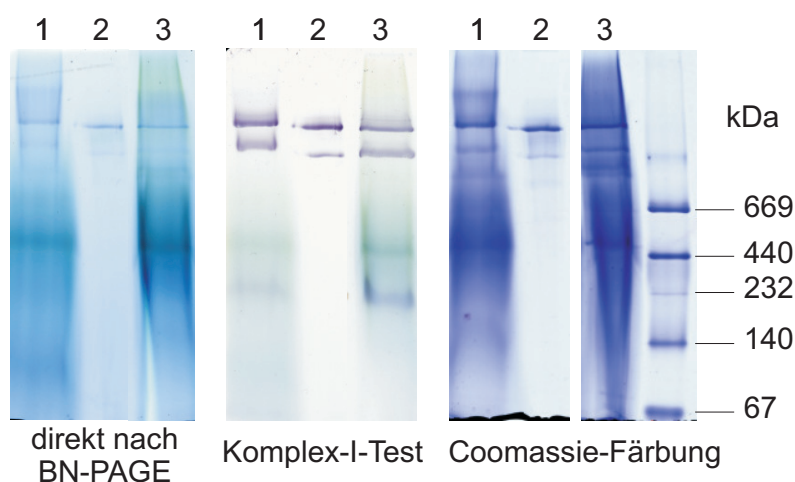


Abbildung 5.51: Analytisches BN-Gel das mit einem elektroeluierten Superkomplex aus *E. gracilis* beladen worden ist (Spur (2)). Im Unterschied zu vorigen Solubilisierungen wird hier die Solubilisierung mit einem Puffer für BHM durchgeführt (Tabelle 5.5). Vergleichend ist in Spur (1) und (3) jeweils Solubilisat aus *E. gracilis*-Mitochondrien mit BHM-Puffer bzw. mit normalem Puffer aufgetragen. Links ist das BN-Gel direkt nach der Elektrophorese gezeigt, in der Mitte nach Inkubation in Komplex-I-Testpuffer und rechts nach Färben mit Coomassie.

Vergleicht man die mit unterschiedlichen Solubilisierungspuffern erhaltenen Solubilisate, so fällt vor allem im direkt nach der Elektrophorese dokumentierten Gel auf, dass das Solubilisat mit BHM-Puffer zu Beginn des Trenngels deutlich weniger grün erscheint als das beim Solubili-

sat mit herkömmlichem Puffer der Fall ist (siehe Spuren (1) und (3) links in Abbildung 5.51). Aufgrund des etwas saureren pH-Wertes im BHM-Solubilisierungspuffer (pH 7,4 gegenüber pH 8,0 im herkömmlichen Puffer) scheinen hochmolekulare, Chlorophyll-enhaltende Proteinkomplexe weniger stabil zu sein, sodass der grünlich verschmierte Bereich zu Beginn des Trenngels verschwindet. Außerdem scheinen sowohl der Anteil als auch die Aktivität von $S_{\text{groß}}$ mit BHM-Solubilisierungspuffer größer als mit dem herkömmlichen Puffer zu sein (vergleiche Spuren (1) und (3) in Abbildung 5.51).

5.4.3 Elutionen aus DHEBA-quervernetzten PA-Gelen

Der limitierende Faktor bei Elutionen von Proteinkomplexen aus nativen PA-Gelen ist die Gelmatrix an sich. Durch Verwendung des längeren und hydrophileren Quervernetzers N,N' -(1,2-Dihydroxyethylen)-bisacrylamid (DHEBA) erhält man eine Gelmatrix, die gegenüber mit N,N' -Methylenbisacrylamid quervernetzten PA-Gelen eine größere Maschenweite aufweist.

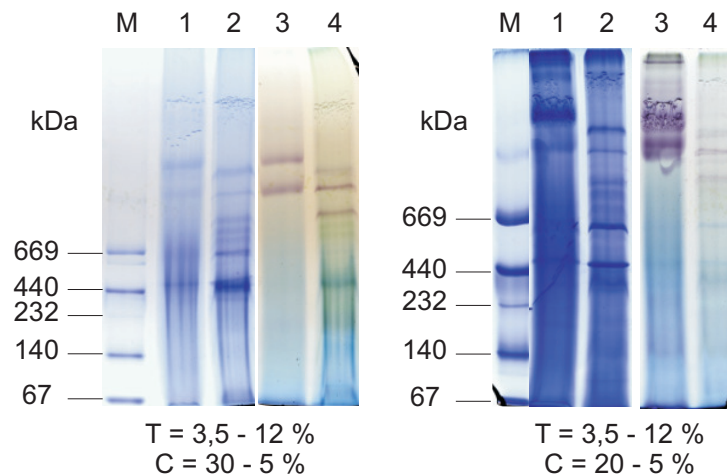


Abbildung 5.52: Zwei BN-DHEBA-Gele mit unterschiedlichen Konzentration an Quervernetzer. Die Spuren (1) und (3) enthalten solubilisierete Mitochondrien aus *E. gracilis*, die Spuren (2) und (4) aus *C. reinhardtii*. Die jeweiligen Spuren werden in Komplex-I-Testpuffer inkubiert bzw. Coomassie gefärbt. Es zeigt sich, dass ein fallender Gradient an C (20–5 % (w/w) DHEBA) vergleichbar in Bezug auf das Laufverhalten von Proteinen im klassischen Gelsystem ist. Die mit (M) bezeichneten Spuren enthalten den Proteinstandard HMW.

Eine Erhöhung der Maschenweite und der Hydrophilie der Gelmatrix sollte mit einer Erleichterung der Elution von Proteinkomplexen hieraus einhergehen. Nach mehreren Versuchen hat sich ein steigender Gradient an T (3,5–12 %) und ein zugleich fallender Gradient an C (20–5 %) als vergleichbar in Bezug auf das Laufverhalten von Proteinen im Gelsystem Acrylamid/Methylenbisacrylamid erwiesen. In Abbildung 5.52 sind zwei Beispiele von BN-DHEBA-Gele mit unterschiedlichen Gradienten an C gezeigt.

Präparative CN-DHEBA-Gele (C 20–5 % (w/w), $18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke 5,8 mm) werden testweise mit Digitonin-solubilisierten BHM ($16 \text{ g Detergens g}^{-1} \text{ Protein}$, $2 \text{ mg mL}^{-1} \text{ Proteinkonzentration}$) beladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Elektrophorese werden schmale Referenzstreifen in Komplex-I-Aktivitätstestlösung inkubiert, um entsprechende Ban-

den im CN-Gel für die Elution lokalisieren zu können. Abbildung 5.53 zeigt zusätzlich zu diesem Referenzstreifen einen mit dem Proteinmarker HMW beladenen, Coomassie gefärbten Streifen.

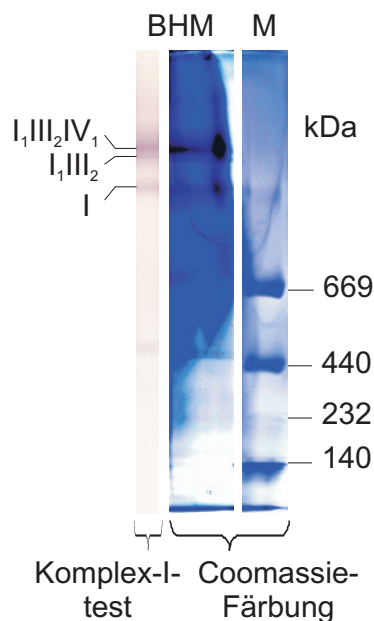


Abbildung 5.53: Referenzstreifen eines mit solubilisierten BHM beladenen präparativen CN-DHEBA-Gels. Ein Streifen wird in Komplex-I-Aktivitätstestlösung zur Lokalisierung NADH-Dehydrogenase-enthaltender Banden inkubiert, der andere, der zusätzlich den Proteinmarker HMW (Spur (M)) enthält, Coomassie gefärbt.

Aufgrund der sehr diffus gefärbten Banden nach dem Aktivitätstest auf Komplex I können die beiden Superkomplexbanden (I_1III_2 und $I_1III_2IV_1$) nur sehr ungenau ausgeschnitten werden. Die Proteine werden hier per Diffusion eluiert und die erhaltenen Eluate mit Hilfe verschiedener Ultrafiltrationseinheiten konzentriert. Die Analyse der Eluate per BN-PAGE (Abbildung 5.54) zeigt zwar, dass die Elution von Proteinkomplexen aus CN-DHEBA-Gelen prinzipiell funktioniert, allerdings wieder ein Gemisch an Superkomplexen und sogar Komplex-I-Monomer vorliegt. Hier kann jedoch nicht genau gesagt werden, ob ein Zerfall von Superkomplexen während der Elution stattfand oder beim Ausschneiden mehr als nur die individuellen Banden abgetrennt wurden. Spur (1) zeigt neben einer schwachen Bande für I_1III_2 eine intensive Bande, die auf das Monomer von Komplex I zurückzuführen ist. Spur (2) in Abbildung 5.54 enthält beide Superkomplexe, die sowohl nach dem Test auf Komplex-I-Aktivität als auch nach Coomassie-Färbung intensiv gefärbt werden. Aber auch hier ist eine intensiv gefärbte Komplex-I-Monomerbande festzustellen. In beiden Eluates findet man Proteinbanden (rote Pfeile in Abbildung 5.54), die auf Zerfallsprodukte aus Superkomplexen hinweisen. Bei der durch den oberen Pfeil markierten Bande könnte es sich um III_2IV_1 einem Zerfallsprodukt des Superkomplexes $I_1III_2IV_1$ handeln. Ebenfalls denkbar wäre, dass diese Bande auf Komplex V zurückzuführen ist, der eine ähnliche Masse wie III_2IV_1 aufweist. Es könnte sich hierbei um aus dem Dimer zerfallenen Komplex V handeln, wobei das Dimer auf Grund des geringen Masseunterschiedes zu I_1III_2 fälschlicherweise zusammen mit diesem Superkomplex ausgeschnitten worden sein könnte. Die durch die

beiden unteren Pfeile markierten Banden könnten auf die Dimere der Komplexe III und IV hinweisen, die ebenfalls Zerfallsprodukte aus Superkomplexen sind.

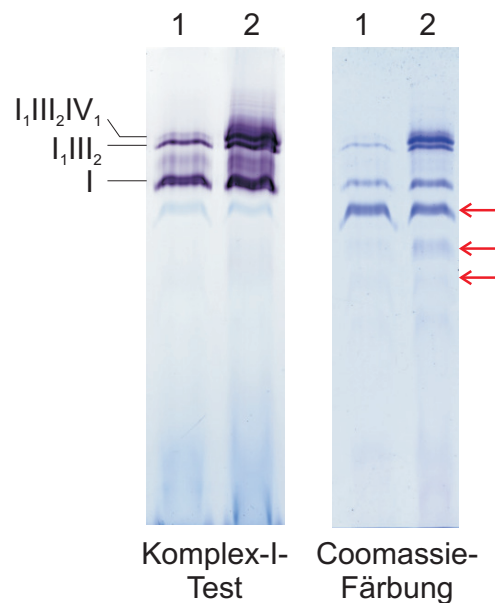


Abbildung 5.54: BN-Gel beladen mit den per Diffusion eluierten BHM-Superkomplexen I_1III_2 (Spur (1)) und $I_1III_2IV_1$ (Spur (2)). Die Elution erfolgt aus präparativen CN-DHEBA-Gelen (Abbildung 5.53). Ein Teil des BN-Gels wird nach der Elektrophorese auf NADH-Dehydrogenase-Aktivität hin untersucht (links) und der andere Teil Coomassie gefärbt. Die roten Pfeile deuten auf mögliche Zerfallsprodukte der Superkomplexe hin.

Aufgrund der sehr diffusen Färbung der Komplex-I-enthaltenden Superkomplexebanden aus BHM im CN-DHEBA-Gel nach Inkubation in NADH-Dehydrogenase-Aktivitätstestlösung erfolgt eine erneute präparative Gelelektrophorese, allerdings als blau-native Variante mit DHEBA als Quervernetzer. Zur eventuellen Verbesserung des Laufverhaltens im präparativen Gel wird die Geldicke von 5,8 mm auf 1,5 mm reduziert. Anders als in Abbildung 5.53 werden hier Mitochondrien aus *E. gracilis* mit Digitonin solubilisiert (Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis 25 g g^{-1} , $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ Chlorophyllkonzentration) und gelelektrophoretisch getrennt. Abbildung 5.55 zeigt das direkt nach der Elektrophorese dokumentierte BN-DHEBA-Gel sowie einen in Komplex-I-Testpuffer inkubierten Referenzstreifen, der mit solubilisierten BHM beladen ist. Schon direkt nach der BN-PAGE erkennt man auf Höhe des Superkomplexes $I_1III_2IV_3$ der BHM-Referenz eine blau gefärbte Bande, die auch bei dem Test auf Komplex-I-Aktivität intensiv gefärbt wird. Diese Bande wird ausgeschnitten und elektroeluiert. Die Elution findet über Nacht bei 75 V und 2 mA pro Elutionszelle statt. Es wird hier bewusst keine Diffusionselution durchgeführt, um einen direkten Vergleich mit dem *E. gracilis*-Eluat aus einem nicht-DHEBA quervernetzten BN-Gel zu haben (siehe Abbildung 5.44 auf Seite 123). Zur Analyse des erhaltenen Eluates aus dem präparativen BN-DHEBA-Gel wird dieses auf ein BN-Gel aufgetragen und nach der Elektrophorese ein Teil des Gels in Komplex-I-Testpuffer inkubiert und der andere Teil Coomassie gefärbt (Abbildung 5.56).

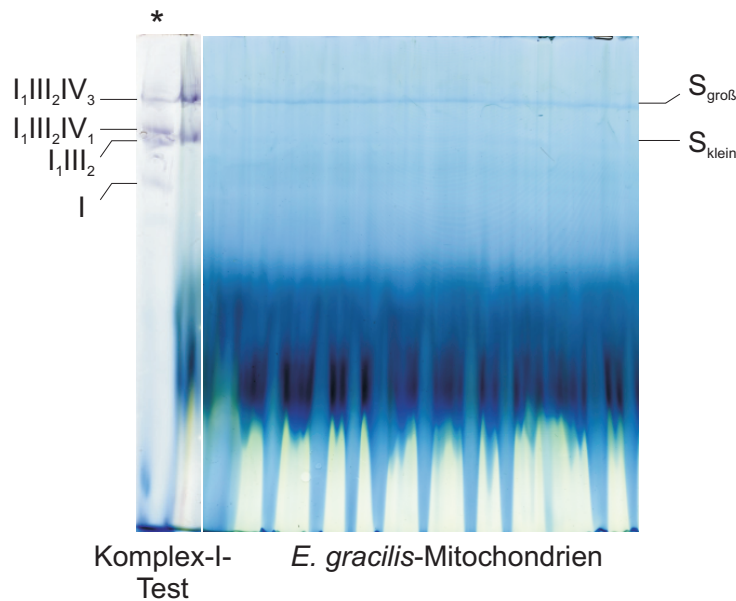


Abbildung 5.55: Präparatives BN-DHEBA-Gel ($18,0 \times 16,0 \text{ cm}^2$, Dicke $1,5 \text{ mm}$) mit solubilisierten *E. gracilis*-Mitochondrien. Das Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnis beträgt 25 g g^{-1} bei einer Chlorophyll-Endkonzentration von $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$. In einer Referenzspur werden $14 \mu\text{g}$ solubilierte BHM aufgetragen (links *) und der Streifen zusammen mit einem schmalen Streifen des *E. gracilis*-Solubisates nach der Elektrophorese in Komplex-I-Testpuffer zur Lokalisierung Komplex-I-enthaltender Superkomplexbanden im BN-DHEBA-Gel inkubiert.

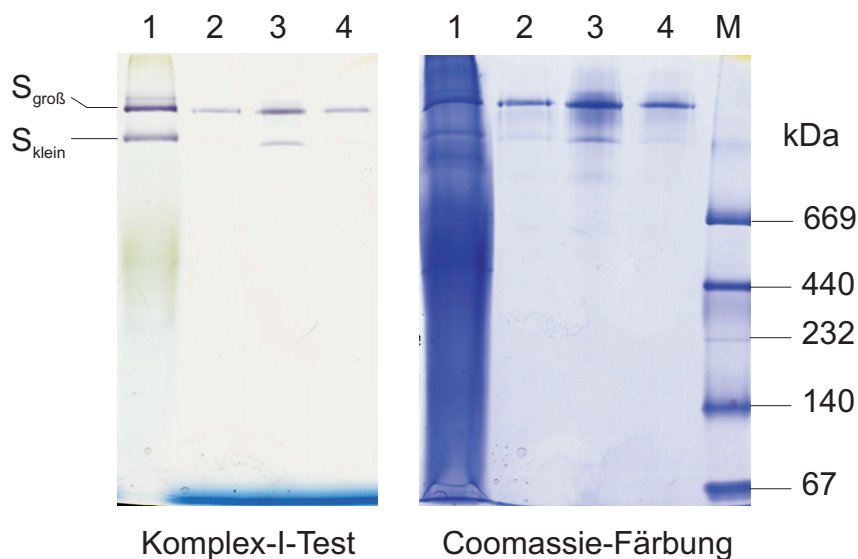


Abbildung 5.56: BN-PAGE-Analyse des erhaltenen Elektroeluates aus einem präparativen BN-DHEBA-Gel (Abbildung 5.55). Zusätzlich zu den $30 \mu\text{L}$ dieses Eluates (Spur (2)) werden die Spuren (3) und (4) mit je $15 \mu\text{L}$ des *E. gracilis*-Superkomplex-Eluates aus Abbildung 5.45 mit bzw. ohne Digitonin-Zugabe beladen. Spur (1) enthält das Mitochondriensolubilisat aus *E. gracilis*. Der Coomassie gefärbte Teil des Gels (rechts) enthält den Proteinmassenstandard HMW (M).

Deutlich zu erkennen ist, dass die Elektroelution des intakten Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ aus dem BN-DHEBA-Gel durchgeführt werden konnte. Auf den ersten Blick entdeckt man zwischen den Eluaten in den Spuren (2) und (4) keinen Unterschied. Beide zeigen nach Inkubation

in Komplex-I-Aktivitätstestlösung eine Bande und im Coomassie gefärbten Teil zusätzlich eine sehr schwach gefärbte Bande, die auf S_{klein} zurückzuführen ist. Der Anteil des kleineren Superkomplexes scheint allerdings sehr gering zu sein, da nach Inkubation im Komplex-I-Testpuffer hier keine Bande festzustellen ist. Die Tatsache, dass in Spur (2) das doppelte Volumen im Vergleich zu Spur (4) aufgetragen worden ist und die Intensitäten beider Superkomplexbanden gleich zu sein scheinen, spricht für eine geringere Menge an isoliertem Superkomplex aus dem BN-DHEBA-Gel. Durch die Quervernetzung des PA-Gels mit DHEBA sollte eine größerer Maschenweite sowie eine Erhöhung der Hydrophilie generiert werden, die die Elution von Proteinkomplexen aus dieser Gelmatrix erleichtert. Da hier im Vergleich zum präparativen BN-Gel in Abbildung 5.44 die gleiche Menge an solubilisierten *E. gracilis*-Mitochondrien aufgetragen wurde und ein ähnliches Restvolumen zur Resuspension des auf der Membran konzentrierten Eluates verwendet worden ist (ca. 400 μL), muss die Elution aus dem BN-DHEBA-Gel an sich weniger effizient vonstattengegangen sein.

5.5 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Die in den vorangegangenen Abschnitten diskutierten Ergebnisse bezüglich der verschiedenen Aufreinigungs- und Isolierungsmethoden von Organellen und Protein(super)komplexen stellen wichtige Probenvorbereitungen für elektronenmikroskopische Untersuchungen dar. Sowohl für Untersuchungen von Thylakoidmembranen durch Cryo-Elektronen-Tomographie, als auch für Einzelpartikelanalysen von Proteinsuperkomplexen per EM müssen die zu untersuchenden Proben in hoher Reinheit und Konzentration vorliegen. Zusätzlich zu den bereits diskutierten Probenvorbehandlungen ist es für Tomographie-Untersuchungen an Thylakoidmembranen aus Chloroplasten erforderlich, dass diese entsprechend den in Abschnitt 4.5 (Seite 40) beschriebenen Methoden getrennt und entstapelt werden. Zunächst werden die hierbei erhaltenen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Im Anschluss daran erfolgt die Diskussion der Ergebnisse der Einzelpartikelanalysen von pflanzlichen Proteinsuperkomplexen.

5.5.1 Cryo-Elektronen-Tomographie

Entsprechend der in Abschnitt 4.5 beschriebenen Durchführung werden zur Trennung und Entstapelung von Thylakoidmembranen Chloroplasten aus *E. gracilis* und *C. reinhardtii* (photomixotrophe und photoautotrophe Anzucht) verwendet. Gestapelte sowie entstapelte Thylakoide der Chloroplasten werden per Differentialzentrifugation erhalten. Nach 30 min Zentrifugation bei $10000 \times g$ werden gestapelte Grana sedimentiert. Durch Zentrifugation des hieraus erhaltenen Überstandes bei $40000 \times g$ (30 min) sedimentiert man einen Zwischenbereich, der mit entstapelten Granalamellen angereichert ist. Mit einem abschließenden einstündigen Zentrifugationsschritt bei $144000 \times g$ erhält man Stromalamellen im Sediment. Die Analyse der in diesen unterschiedlichen Sedimenten enthaltenen Proteine erfolgt per SDS-PAGE. Zusätzlich werden die denaturierend aufgetrennten Proteine mit Hilfe einer Western-Blot-Apparatur elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran transferiert und diese anschließend verschiedenen immunologischen Analysen unterzogen. Abbildung 5.57 zeigt ein Coomassie gefärbtes SDS-

Gel, das mit den Sedimenten der jeweiligen Zentrifugationsschritte beladen worden ist. 15 μL jedes resuspendierten Sedimentes werden mit 15 μL SDS-Auftragspuffer versetzt und nach 10-minütiger Inkubation je 19 μL der Mischung auf das SDS-Gel aufgetragen.

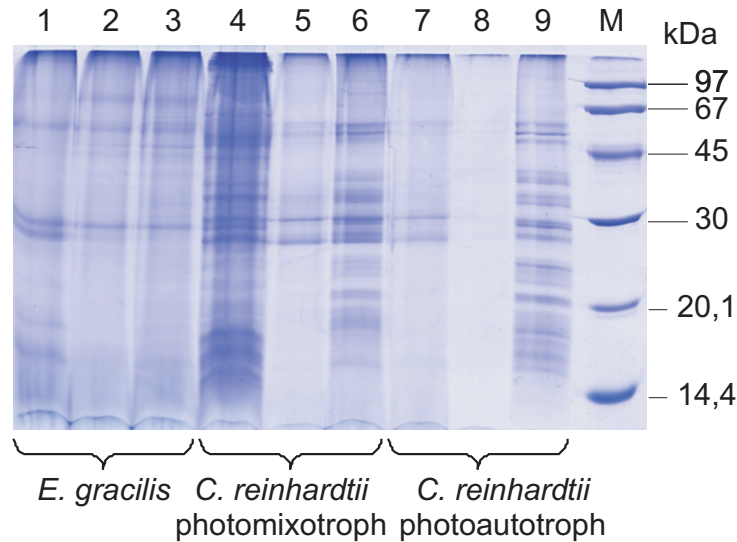


Abbildung 5.57: SDS-PAGE-Analyse der mittels Differentialzentrifugation getrennten gestapelten und entstapelten Thylakoide aus *E. gracilis*- (Spuren 1–3) und *C. reinhardtii*-Chloroplasten (Spuren 4–9). Die Spuren (1), (4) und (7) werden mit gestapelten Grana der jeweiligen Organismen bzw. Anzuchtbedingungen beladen. Die Spuren (2), (5) und (8) enthalten entsprechend entstapelte Granalamellen, die Spuren (3), (6) und (9) Stromalamellen. Pro Spur werden 19 μL einer 1:1 Mischung der jeweiligen Probe mit SDS-Auftragspuffer aufgetragen. Spur (M) enthält den Proteinstandard LMW. Nach der Elektrophorese wird das Gel Coomassie gefärbt.

Offensichtlich scheint die Trennung von gestapelten und entstapelten Thylakoiden funktioniert zu haben. In Abbildung 5.57 enthalten die Spuren (1), (4) und (7) gestapelte Grana, die Spuren (2), (5) und (8) entstapelte Granalamellen und die Spuren (3), (6) und (9) Stromalamellen. Für die hier durchgeführten Trennungen werden Chloroplasten aus *E. gracilis* (Spuren 1–3) und *C. reinhardtii* (Spuren 4–9) verwendet. Bei den Chloroplasten aus *C. reinhardtii* wird zusätzlich noch zwischen photomixotropher und photoautotropher Anzucht diskriminiert. Für die Trennung von gestapelten und entstapelten Thylakoiden sind bezüglich der Proteinmuster für Chloroplasten aus *C. reinhardtii* größere Unterschiede als für *E. gracilis* zu verzeichnen. Im Fall der *C. reinhardtii*-Proben stellt man für beide Anzuchtarten den größten Proteingehalt in gestapelten Grana und Stromalamellen fest. Der Zwischenbereich mit entstapelten Granalamellen enthält im Vergleich hierzu deutlich weniger Proteine, dies gilt besonders für die photoautotrophe Anzucht (Spur (8)). Da eine genaue Zuordnung der Banden im SDS-Gel schwierig ist, werden die Proteine per Western-Blot auf eine PVDF-Membran transferiert und mit verschiedenen Antikörpern markiert. Es werden Antikörper gegen Untereinheiten aus den Photosynthesekomplexen PSI, PSII und Cytochrom b_6f sowie gegen Untereinheiten der CF_0F_1 verwendet. Die Beladung der SDS-Gele für die immunologischen Analysen ist identisch mit der in Abbildung 5.57, nur werden 10 μL Proben/SDS-Auftragspuffergemisch aufgetragen. Als Proteinstandard wird MagicMark[™] eingesetzt.

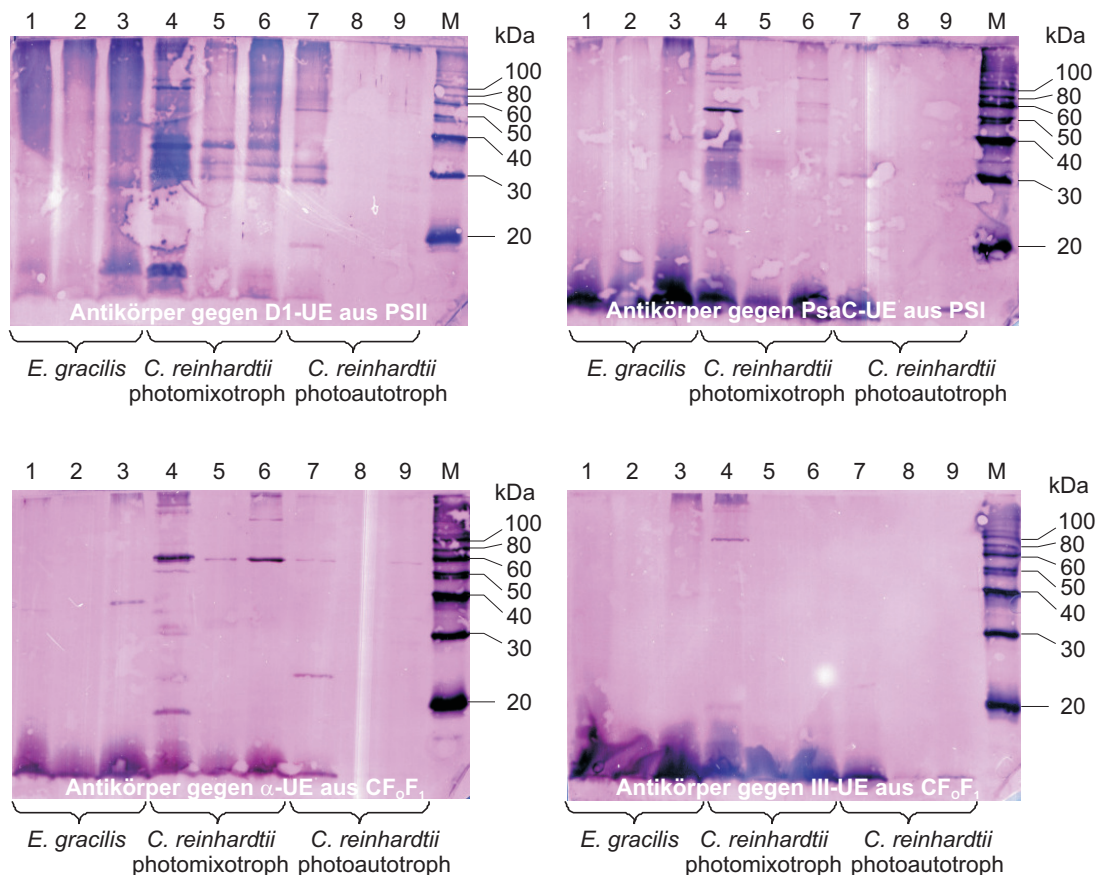


Abbildung 5.58: Western-Blot gestapelter Grana, entstapelter Granalamellen und Stromalamellen aus *E. gracilis*- und *C. reinhardtii*-Chloroplasten. Die Beladung der geblotteten SDS-Gele ist identisch mit der Beladung des Gels in Abbildung 5.57. Statt des LMW-Markers ist der Proteinstandard MagicMark™ verwendet worden, und das Probenauftragsvolumen wurde auf 10 µL reduziert. Die Blotmembranen werden mit Antikörpern gegen die Photosystem-Untereinheiten D1 (apparente Molmasse 30 kDa, PSII) und Psac (apparente Molmasse 10 kDa, PSI) sowie gegen die Untereinheiten α und III der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat inkubiert. Die Detektion der immunologisch markierten Proteine erfolgt über das alkalische-Phosphatase-System.

In der gestapelten Grana-Domäne sollte vermehrt der Proteinkomplex PSII zu finden sein. Bei Betrachtung der Blotmembran links oben in Abbildung 5.58 ist das für beide *C. reinhardtii*-Anzuchten der Fall (Spuren (4) und (7)). Hier ist die Intensität an gefärbten Banden höher als für die entstapelten Granalamellen oder die Stromalamellen. Für *E. gracilis* (Spuren 1–3) scheint der hier verwendete Antikörper keine spezifische Reaktivität zu zeigen, da im Vergleich zu *C. reinhardtii* keine diskreten Banden gefärbt werden. In entstapelten Bereichen, also den Stromalamellen, müsste sich hauptsächlich PSI befinden. In Spur (3) rechts oben in Abbildung 5.58 kann diese Tendenz für *E. gracilis* festgestellt werden. Für die entsprechenden Proben aus *C. reinhardtii* ist dies schwach für die photoautotrophe Anzucht zu erkennen (Spur (9)), für die photomixotroph angezogene Kultur jedoch nicht. Hier werden für die gestapelte Grana-Domäne Banden intensiver gefärbt als für Stromalamellen. Auch ATP-Synthasen sollten hauptsächlich in entstapelten Thylakoiden zu finden sein. Wie in Abbildung 5.58 links unten zu sehen ist, erkennt man zwar eine Bande für die α -UE in der Stromalamellenfraktion der photomixotrophen *C. reinhardtii*-Chloroplasten (Spur (6)), allerdings findet sich diese ebenfalls intensiver gefärbt

in der gestapelten Grana-Domäne (Spur (4)). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass sich während der Fraktionierung der gestapelten und ungestapelten Thylakoide der F_1 -Teil gelöst hat und somit zusammen mit gestapelten Grana-Thylakoiden sedimentiert worden ist. Für die photoautotrophe Anzucht zeigt sich ein ähnliches Bild, nur dass hier die Bandenfärbung deutlich weniger intensiv ist. In Spur (4) der rechts unten gezeigten Blotmembran zeichnet sich ein Oligomer der Untereinheit III der ATP-Synthase ab. Auch hier ist es ungewöhnlich, diese Untereinheit in der Fraktion gestapelter Grana zu finden und nicht in entstapelten Stromalamellen. Für die fraktionierten Thylakoide aus *E. gracilis* erfolgt zwar teilweise Bandenfärbung auf der Blotmembran nach Inkubation mit den Antikörpern gegen Untereinheiten der CF_0F_1 , hierbei handelt es sich allerdings eher um nicht spezifische Färbungen. Anders als die Proteinkomplexe PSI und PSII sollte Cytochrom b_6f sowohl in gestapelten Grana als auch in Stromalamellen annähernd gleichverteilt vorliegen. Testweise wird hierzu eine Blotmembran mit fraktionierten Thylakoiden aus *E. gracilis* mit Antikörpern gegen die Untereinheit Cytochrom b_6 inkubiert und die markierten Proteine mit Hilfe des AP-Systems detektiert (Daten nicht gezeigt). Wie erwartet findet man in allen drei Fraktionen dieses Protein zu gleichen Anteilen.

Aufgrund der umfangreichen Probenvorbereitung zur Erstellung von Elektronen-Tomogrammen ist es nicht auszuschließen, dass die Probe während dessen beschädigt wird. Als Beispiel sei hier ein möglicher Zerfall der ATP-Synthase in CF_0 und CF_1 genannt. Um die zu untersuchenden Proben nicht auch noch zusätzlich lagerungsbedingten Schädigungen auszusetzen, werden alle vorbereitenden Schritte, inklusive des Zellaufschlusses und der Chloroplasten-Isolierung, unmittelbar vor der elektronenmikroskopischen Aufnahme durchgeführt. Nach abschließender Resuspension der fraktionierten Thylakoide (Grana-Stapel, Zwischenbereich mit entstapelten Granalamellen und Stromalamellen) in einem Minimalpuffer (siehe Tabelle 4.23 auf Seite 41) werden alle direkten Probenvorbereitungen für die EM von Bertram Daum am Max-Planck-Institut für Biophysik in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Werner Kühlbrandt in Frankfurt am Main durchgeführt. Abbildung 5.59 zeigt eine Tomographie-Aufnahme der gestapelten Grana-Fraktion aus *C. reinhardtii*-Chloroplasten. Hier wird eine photoautotrophe Anzucht verwendet, da diese im Vergleich zur photomixotrophen besser gewachsen ist. Mit roten Pfeilen markiert erkennt man den F_1 -Teil von ATP-Synthasen. Weiterhin sichtbar sind die mit blauen Pfeilen markierte Thylakoidmembran sowie die zentralen Stiele der ATP-Synthasen (grüne Pfeile). Der relativ niedrige Kontrast in Abbildung 5.59 deutet auf einen für elektronenmikroskopische Untersuchungen zu hohen Grad an Probenverunreinigung hin. Des Weiteren handelt es sich bei der hier gezeigten Aufnahme um die einzige in der Probe gefundene Membran, die zu erahnende intakte ATP-Synthasen enthält.

Zur Probenaufreinigung werden die in Abschnitt 4.4.2 vorgestellten Methoden der Dichtegradientenzentrifugation mit Percoll® eingesetzt, deren Ergebnisse in Abschnitt 5.3.1 diskutiert worden sind. Es wird ein Organellengemisch einer photomixotrophen *C. reinhardtii*-Anzucht gereinigt (Fraktion 2 des Gradienten in Abbildung 5.7 auf Seite 85) und das Chloroplasten-Sediment nach der Percoll®-Entfernung nicht wie zuvor mit Digitonin behandelt, sondern in Lysepuffer resuspendiert (Tabelle 4.23, Seite 41).

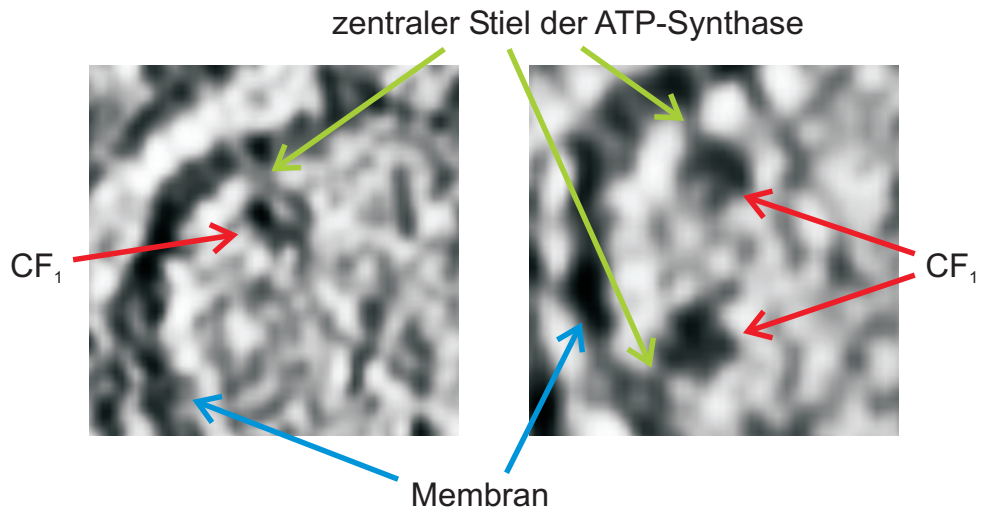


Abbildung 5.59: Cryo-Elektronen-Tomogramm der gestapelten Grana-Fraktion aus Chloroplasten einer photoautotrophen *C. reinhardtii*-Anzucht. Die entsprechend mit Pfeilen markierten Bereiche weisen auf den CF₁-Teil der ATP-Synthase (rot), die Thylakoidmembran (blau) sowie den zentralen Stiel der CF₀F₁ hin (grün).

Gegenüber der kurzen Behandlung mit Digitonin ist dieses osmotische Aufbrechen der Chloroplasten effektiver. Diese Methode führt allerdings dazu, dass keine gestapelten Grana mehr sedimentiert werden können, da diese nach dem osmotischen Schock offensichtlich schon entstapelt worden sind. Aus diesem Grund werden hier alle Membranen gemeinsam sedimentiert. Die hierbei erhaltenen Pellets werden in 30 µL Minimalpuffer resuspendiert und im Anschluss elektronenmikroskopisch untersucht. Gegenüber der EM-Untersuchung der nicht aufgereinigten Proben erkennt man in Abbildung 5.60, dass der Kontrast wesentlich verbessert worden ist, die Probenaufreinigung für EM-Untersuchungen also essentiell ist. Auch die Abwesenheit eines eventuell störenden Detergens scheint für die hier gemachten Aufnahmen von Vorteil zu sein. Es zeigt sich in Abbildung 5.60, dass sowohl Stromalamellen als auch teilweise entstapelte Grana in der Probe enthalten sind. Die mit roten Pfeilen markierten F₁-Köpfe von ATP-Synthasen werden hauptsächlich an Stromalamellen festgestellt. In gestapelten Regionen von Thylakoiden fehlt es an Platz für den großen, hydrophilen F₁-Teil der ATP-Synthase. In Stromalamellen dagegen ist für diesen Proteinkomplex genügend Platz. Die in beiden Abbildungen (5.59, 5.60) gefundenen ATP-Synthasen scheinen immer in ihrer monomeren Form vorzuliegen. Es können zwar ATP-Synthasen abgebildet werden, die sehr nahe beieinander liegen (siehe Abbildung 5.60 rechts oben), aber nicht die typische gewinkelte Struktur wie mitochondriale ATP-Synthase-Dimere aus Säugern^[37] oder Algen^[106] aufweisen. In Analogie zu diesen ATP-Synthase-Dimeren in Mitochondrien, die vermutlich die Morphologie der Cristae gestalten, wäre die Induzierung gekrümmter Strukturen in Thylakoidmembranen durch ATP-Synthase-Dimere in Chloroplasten denkbar. Neben den abgebildeten ATP-Synthasen und verschiedenen Thylakoiden fallen besonders in der Mitte und unten in Abbildung 5.60 Bereiche auf, in denen sich Partikel sehr hoher Elektronendichte befinden (schwarze Punkte). Höchst wahrscheinlich handelt es sich hierbei um Reste nicht entfernten Percolls[®].

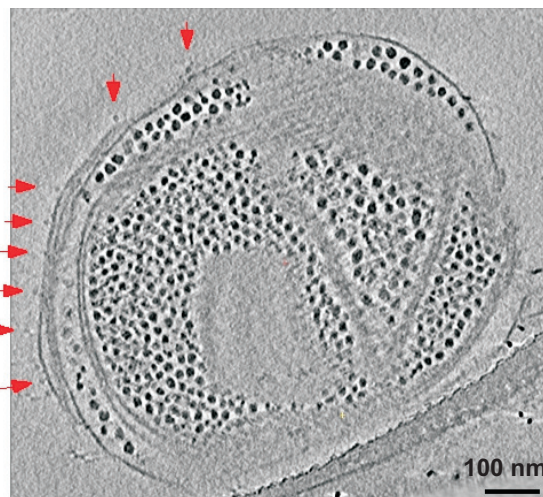
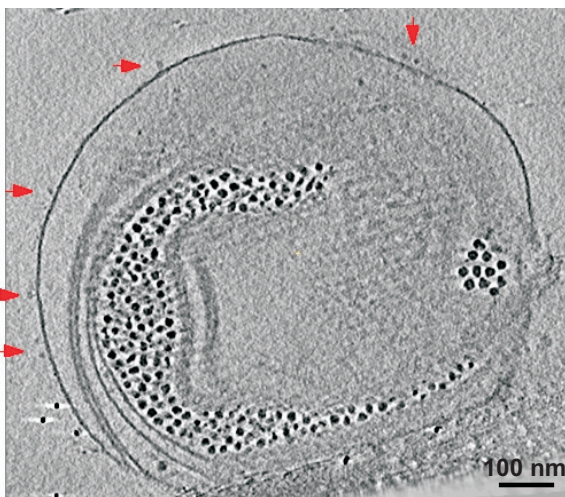
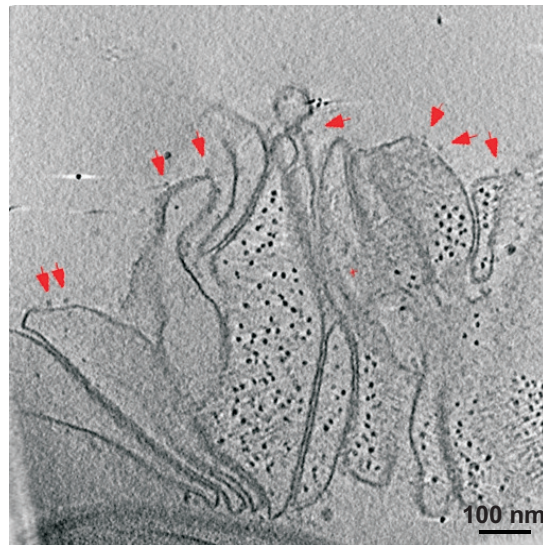
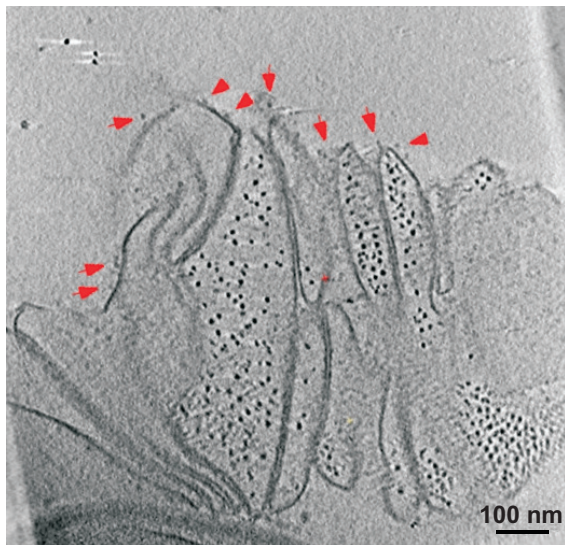
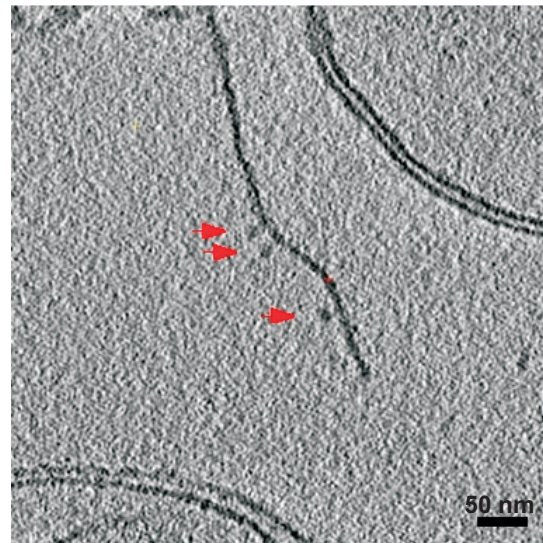
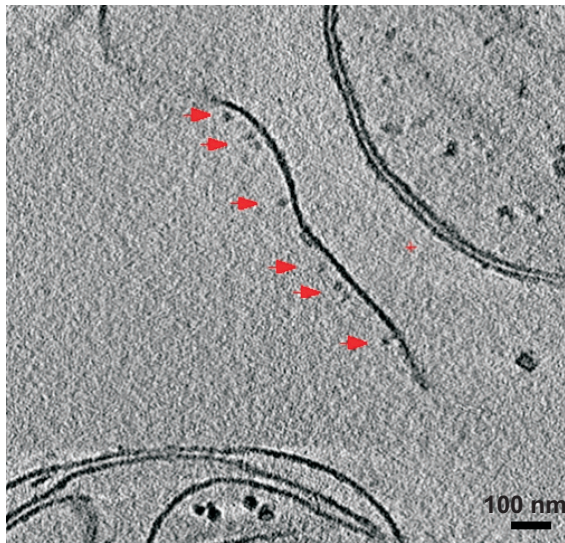


Abbildung 5.60: Cryo-Elektronen-Tomogramme entstapelter Grana-Domänen aus photomixotroph angezogenen und über einen Percoll®-Dichtegradienten (Fraktion 2 Abbildung 5.7) gereinigte *C. reinhardtii*-Chloroplasten. Die mit roten Pfeilen markierten Bereiche weisen auf den CF₁-Teil von ATP-Synthasen hin. Bei den Ansammlungen schwarzer Punkte (hohe Elektronendichte) könnte es sich um Reste nicht entfernten Percolls® handeln. Die rundlichen Strukturen unten ähneln den in Chloroplasten aus *C. reinhardtii* vorkommenden Pyrenoiden.

Der durchschnittliche Durchmesser von Percoll®-Partikeln von ca. 17 nm^[107] stimmt in etwa mit dem Durchmesser dieser schwarzen Punkte in Abbildung 5.60 überein. Die großen rundlichen Strukturen unten in Abbildung 5.60 ähneln in Bezug auf ihren Durchmesser (etwa 1 µm) und ihre Form den in den meisten einzelligen Algen vorkommenden Pyrenoiden. Auch *C. reinhardtii*-Chloroplasten enthalten Pyrenoide in denen das Enzym RuBisCO in großen Mengen lokalisiert ist, welches die CO₂-Fixierung katalysiert^[108].

Mit Hilfe der Cryo-Elektronen-Tomographie konnte somit nicht das Vorhandensein des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *C. reinhardtii* gezeigt werden.

5.5.2 Elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse an Superkomplexen

Zur Strukturaufklärung von mitochondrialen Proteinsuperkomplexen aus Algen werden elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalysen durchgeführt. Die Untersuchungen werden ebenfalls am Max-Planck-Institut für Biophysik in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Werner Kühlbrandt in Frankfurt am Main durchgeführt. Die Einzelpartikelanalysen erfolgen hier durch Dr. Eva Schäfer (Promotion 2006, TU Darmstadt). Es werden sowohl diffusions- als auch elektroeluierte Superkomplexe konzentriert und elektronenmikroskopisch abgebildet. Bei den in Abbildung 5.61 dargestellten elektronenmikroskopischen Aufnahmen handelt es sich um die Abbildung des diffusionseluierten Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii* (siehe Abbildung 5.42 auf Seite 121, Spur (2)). Offensichtlich ist die Konzentration an eluiertem Superkomplex zu gering, sodass keine Partikel in der EM-Aufnahme gefunden werden können.

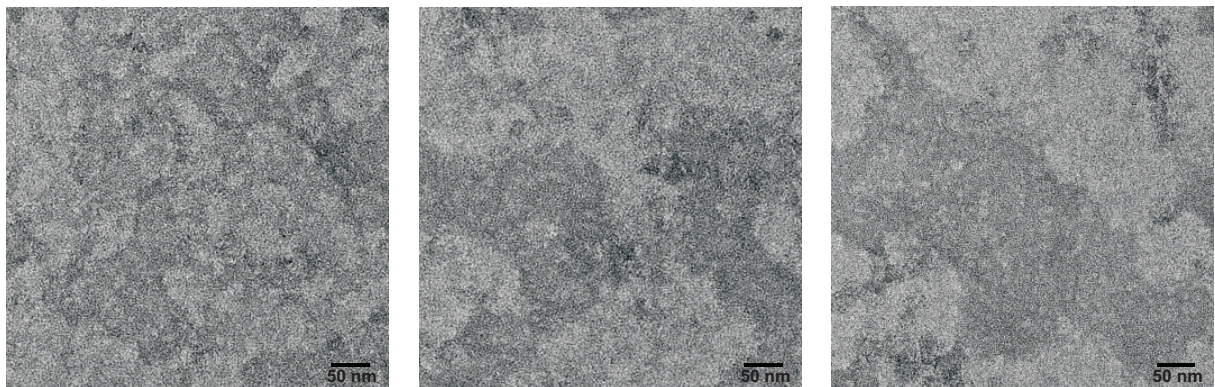


Abbildung 5.61: EM-Aufnahmen des per Diffusionselution erhaltenen Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien (Abbildung 5.42, Seite 121, Spur (2)). Eine zu geringe Konzentration an eluiertem Superkomplex verhindert das Auffinden von Partikeln im EM-Bild. Als Kontrastmittel wird Uranyl-Acetat (1 %) verwendet.

Es wird eine weitere Probe untersucht, der zur Stabilisierung der Superkomplexe während der Diffusionselution jeweils 0,1 mg mL⁻¹ L- α -Phosphatidylcholin und Cardiolipin zugegeben wird (Abbildung 5.43, Seite 121, Spur (2)). Das EM-Bild des diffusionseluierten Superkomplexes aus *C. reinhardtii* ist in Abbildung 5.62 gezeigt. Die Anwesenheit der Lipide im Eluat stellt natürlich für die EM eine Verunreinigung der Probe dar. Wie auch schon die gelelektrophoretische Analyse dieses Superkomplexes zeigte, scheint die Konzentration an eluiertem Superkomplex sehr gering zu sein. Diese geringe Konzentration an Protein zusammen mit der Lipidverun-

reinigung in der Probe führen dazu, dass auch hier keine Superkomplexe aus *C. reinhardtii* abgebildet werden können. Zur elektronenmikroskopischen Strukturaufklärung mitochondrialer Superkomplexe aus BHM^[34] wurden die Proteine per Elektroelution erhalten. Ein großer Vorteil dieser Methode gegenüber der Diffusionselution ist die Tatsache, dass das Eluat auf der anodenseitigen Membran der Elutionszelle konzentriert wird. Die Elution per Diffusion stellt zwar eine sanftere Methode gegenüber der auf Elektrophorese beruhenden Variante dar, die anschließende Konzentrierung des Probenvolumens von etwa 50 mL auf wenige 100 µL per Ultrafiltration kann jedoch ebenfalls zu Beeinträchtigungen der Probe führen. Aus diesem Grund werden für weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen Superkomplexe nur noch per Elektroelution aus nativen Gelen isoliert.

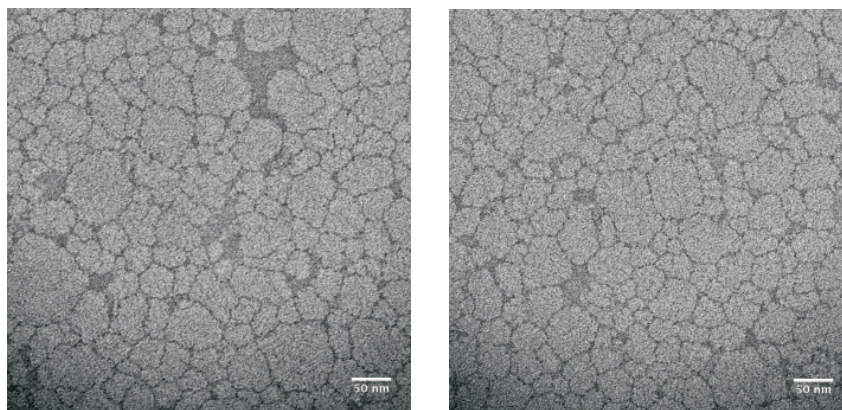


Abbildung 5.62: EM-Aufnahmen des per Diffusionselution erhaltenen Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien (Abbildung 5.43, Seite 121, Spur (2)). Die Zugabe an Lipiden (jeweils 0,1 mg mL⁻¹ L- α -Phosphatidylcholin und Cardiolipin) zur Stabilisierung von Superkomplexen während der Elution führt zu einer Verunreinigung der Probe. Auch hier können keine Proteinkomplexpartikel entdeckt werden. Als Kontrastmittel wird Uranyl-Acetat (1 %) verwendet.

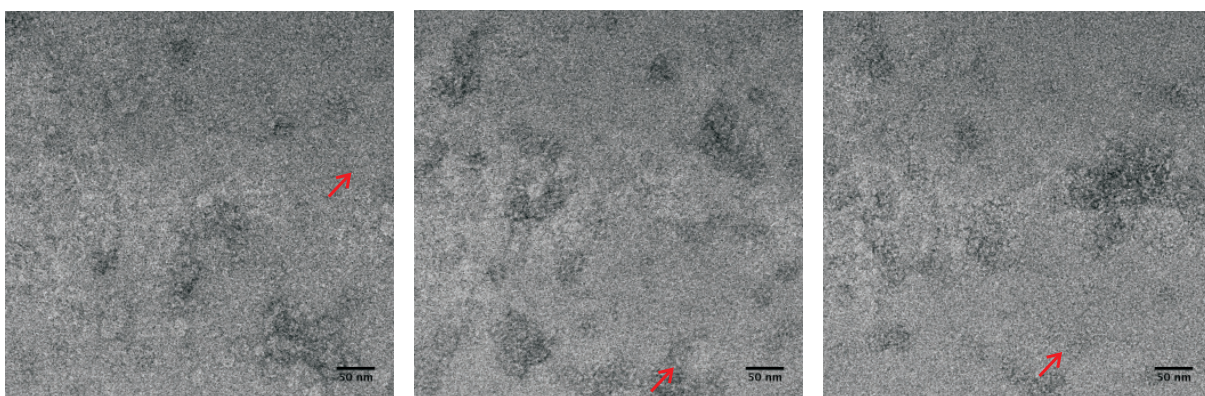


Abbildung 5.63: EM-Aufnahmen des per Elektroelution erhaltenen Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien. Die roten Pfeile deuten auf entdeckte Partikel hin, bei denen es sich um den Superkomplex S1 handeln könnte. Der Kontrast des Bildes ist allerdings weiterhin nicht ausreichend für eine optimale EM-Aufnahme. Die Kontrastierung erfolgt mit Uranylacetat (1 %).

Abbildung 5.63 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahmen des elektroeluierten Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii* (präparatives BN-Gel nicht gezeigt). Im Vergleich zu den EM-

Aufnahmen diffusionseluiertter Superkomplexe (Abbildungen 5.61 und 5.62) ist der Kontrast hier etwas besser geworden, allerdings noch nicht ausreichend für eine optimale EM-Aufnahme. Die mit roten Pfeilen markierten Partikel können nur erahnt werden. Obwohl im Anschluss an die Elektroelution das Eluat per Ultrafiltration konzentriert wird, ist die Konzentration an Superkomplex offensichtlich noch zu gering um genügend Partikel zu erhalten. Entsprechende EM-Untersuchungen des elektroeluierten Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii*-Mitochondrien von Dr. Helena Schwassmann zeigten ebenfalls nur Bilder mit unzureichendem Kontrast für optimale EM-Aufnahmen von Superkomplexpartikeln^[109].

Die Tatsache, dass nach Konzentrierung des eluierten Superkomplexes aus *C. reinhardtii* die Konzentration immer noch zu gering ist, spricht dafür, dass die Konzentration an Superkomplex S1 *per se* für EM-Aufnahmen zu niedrig ist. Ein Organismus, der im Vergleich zu *C. reinhardtii* einen größeren Superkomplex-Anteil aufweist, ist *E. gracilis*. Anders als bei *C. reinhardtii* kann bei *E. gracilis* kein individueller Komplex I festgestellt werden. Somit muss der Anteil an Komplex-I-enthaltenden Superkomplexen in *E. gracilis* deutlich größer sein. Aus diesem Grund wird der elektroeluierte Superkomplex S_{groß} aus *E. gracilis* (siehe Abbildung 5.45 auf Seite 124, Spur (1)) elektronenmikroskopisch untersucht. Abbildung 5.64 zeigt die erhaltenen EM-Aufnahmen.

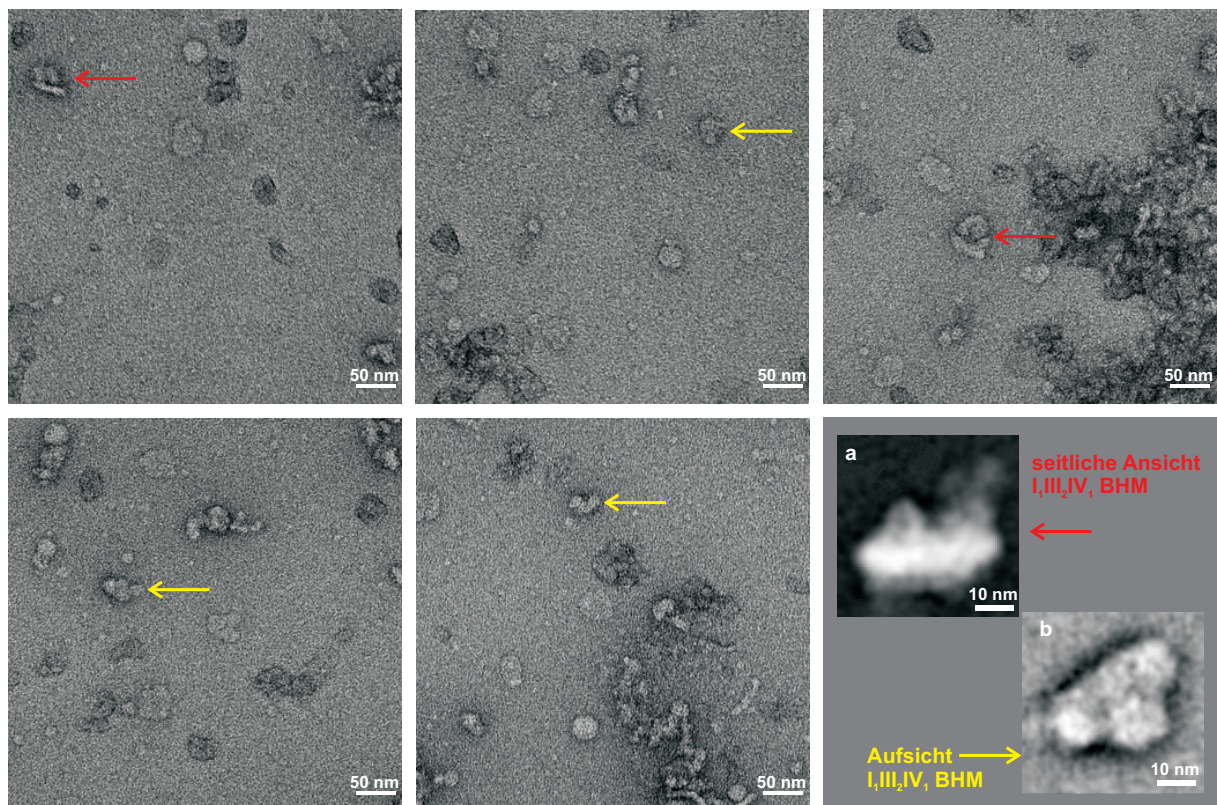


Abbildung 5.64: EM-Aufnahmen des per Elektroelution erhaltenen Superkomplexes S_{groß} aus *E. gracilis*-Mitochondrien. Die Pfeile deuten auf Superkomplexe hin, die in verschiedenen Orientierungen abgebildet sind (rot seitliche Ansicht, gelb Aufsicht). Bei den mit (a) und (b) gekennzeichneten Bildern rechts unten handelt es sich um eine seitliche Ansicht sowie eine Aufsicht des Superkomplexes I₁III₂IV₁ aus BHM^[34,110]. Deutlich ist die Ähnlichkeit mit den Superkomplex-EM-Aufnahmen aus *E. gracilis* zu erkennen.

Nach Elektroelution und Konzentrierung des Superkomplexes $S_{\text{gro\ss}}$ aus *E. gracilis* scheint die Konzentration an Superkomplex ausreichend gro\ss zu sein, um relativ kontrastreiche EM-Aufnahmen erhalten zu k\u00f6nnen. Es sind Superkomplexe in verschiedenen Orientierungen erkennbar. Bei den mit roten Pfeilen markierten Partikeln handelt es sich um seitliche Ansichten des Superkomplexes, die gelben Pfeile weisen auf Aufsichten hin. Vergleicht man diese verschiedenen Orientierungen mit EM-Aufnahmen des Superkomplexes $I_1III_2IV_1$ aus BHM ((a) und (b) rechts unten in Abbildung 5.64), so k\u00f6nnen \u00c4hnlichkeiten in Bezug auf die Form festgestellt werden. In beiden F\u00e4llen erkennt man f\u00fcr die seitlichen Ansichten ein wahrscheinlich auf Komplex I zur\u00fcckzuf\u00fchrendes L-f\u00f6rmiges, liegendes Grundger\u00fcst, das mit weiteren eher rundlichen Proteinkomplexen best\u00fcckt ist (eventuell Komplex III_2 und Komplex IV_x). Diese aufgesetzten Partikel erscheinen in den EM-Aufnahmen von *E. gracilis* deutlich volumin\u00f6ser als bei BHM. Diese Tatsache ist allerdings nicht weiter verwunderlich, da beim Vergleich der elektrophoretischen Migration im BN-Gel der hier eluierte Superkomplex auf gleicher H\u00f6he mit dem Superkomplex $I_1III_2IV_3$ aus BHM l\u00e4uft (siehe Abbildung 5.44). Es kann allerdings keine Aussage dar\u00fcber getroffen werden, ob es sich hierbei auch um die Komplexe III_2 und IV_x oder andere Proteinkomplexe handelt.

Durch Verdoppelung der Konzentration an Uranyl-Acetat bzw. den Einsatz von Ammonium-Molybdat (jeweils 2 %) als Kontrastmittel wird der Versuch unternommen, den Kontrast f\u00fcr EM-Aufnahmen zu erh\u00f6hen. Wie Abbildung 5.65 allerdings zeigt, f\u00fchrte diese Probenvorbehandlung sogar zu einer Verschlechterung des Kontrastes.

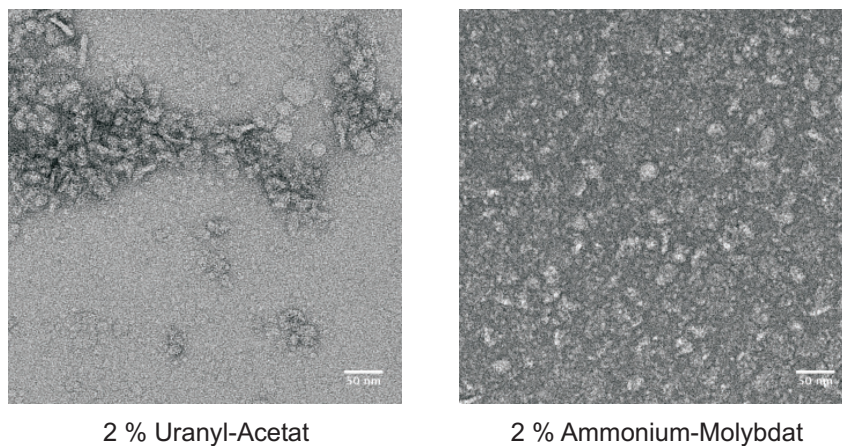


Abbildung 5.65: EM-Aufnahmen des per Elektroelution erhaltenen Superkomplexes $S_{\text{gro\ss}}$ aus *E. gracilis*-Mitochondrien. Durch Vorbehandlung der Probe mit jeweils 2 % Uranyl-Acetat bzw. Ammonium-Molybdat wurde der Versuch unternommen den Kontrast zu verbessern. Allerdings wird eine Kontrastverschlechterung festgestellt.

Es sind zwar Partikel zu erkennen, diese scheinen jedoch nach der Behandlung mit den Kontrastmitteln miteinander zu aggregieren. Die mit Ammonium-Molybdat versetzte Probe wird verd\u00fcnnt, um hier eventuell einzelne Superkomplexe besser abbilden zu k\u00f6nnen, aber dies f\u00fchrt ebenfalls nicht zum gew\u00fcnschten Ziel (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 5.64 dargestellten EM-Aufnahmen zeigen das beste erhaltene Ergebnis in Bezug auf die elektronenmikroskopische Einzelpartikelanalyse des Superkomplexes $S_{\text{gro\ss}}$ aus *E. gracilis*. Es konnte gezeigt werden, dass

mitochondriale Superkomplexe aus Algen, hier *E. gracilis*, strukturell ähnlich zu mitochondrialen Superkomplexen aus Rind aufgebaut sind.

5.6 Charakterisierung von Proteinkomplexen aus verschiedenen Organismen

Zur Charakterisierung von Proteinkomplexen werden unterschiedliche Methoden wie mehrdimensionale Gelelektrophorese, Aktivitätstests und immunologische Nachweise durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methoden wird das Vorhandensein mitochondrialer Atmungskettenkomplexe (in monomerer Form oder als Superkomplexe) sowie monomerer und oligomerer Formen von mitochondrialen und Chloroplasten-ATP-Synthasen aus verschiedenen Organismen überprüft. In Abschnitt 5.6.1 sind zunächst die Ergebnisse bezüglich nachgewiesener Formen von ATP-Synthasen gezeigt und diskutiert.

5.6.1 ATP-Synthasen

Zur Charakterisierung des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *C. reinhardtii* wird unter anderem die Methode der 2D-BN-PAGE (siehe Abschnitt 4.7.3.3 auf Seite 54) eingesetzt. Abbildung 5.66 zeigt ein Coomassie gefärbtes 2D-BN-Gel. In der ersten nativen

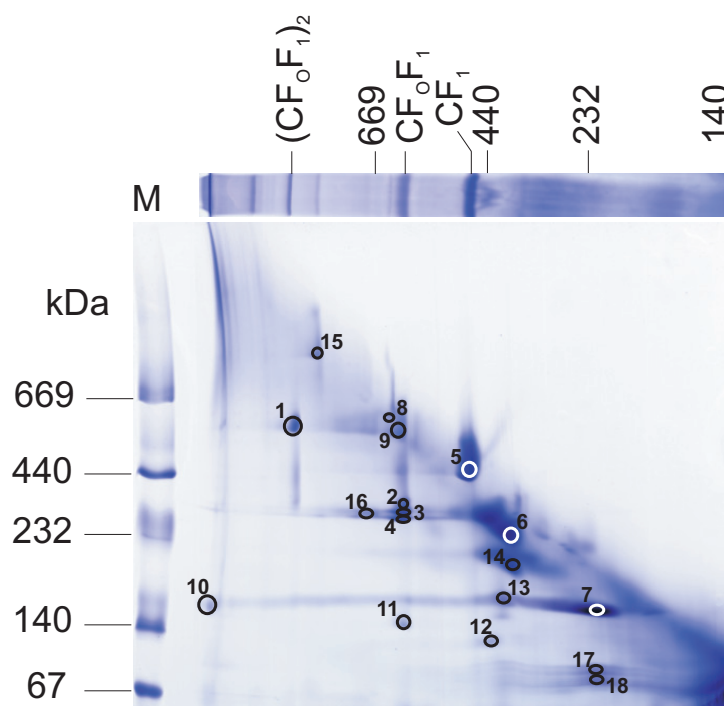


Abbildung 5.66: 2D-BN-Gel solubilisierter Chloroplasten aus *C. reinhardtii* (1,5 % (w/v) Digitonin, 0,4 mg mL⁻¹ Chlorophyllkonzentration, 18,0 × 16,0 cm² BN-Gel). Der Streifen aus der ersten nativen Dimension wird um 90° gedreht und unter Zugabe von 0,02 % (w/v) DDM zum Kathodenpuffer in der zweiten nativen Dimension aufgetrennt. Eine Referenzspur links wird mit dem Proteinstandard HMW beladen (M). Nach der Elektrophorese wird das Gel Coomassie gefärbt und die markierten, nummerierten Spots für weitere Analysen ausgestochen.

Dimension werden solubilisierte *C. reinhardtii*-Chloroplasten einer photomixotrophen Anzucht aufgetrennt (1,5 % (w/v) Digitonin, 0,4 mg mL⁻¹ Chlorophyllkonzentration, 18,0 × 16,0 cm² BN-Gel). Sehr gut ist hier die Diagonale zu erkennen, auf der die intakten Proteinkomplexe laufen, die keine Veränderung durch die DDM-Zugabe zum Kathodenpuffer erfahren. Unterhalb der Diagonalen wandern die Subkomplexe, die aus den Protein(super)komplexen durch Einwirkung der DDM/Coomassie-Mischung entstanden sind. Die markierten, nummerierten Spots im 2D-BN-Gel werden zur Analyse in einem SDS-Gel denaturierend aufgetrennt (3D-SDS-PAGE). Im 2D-BN-Gel erkennt man, dass das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase in das Monomer zerfallen ist (Spot 1 in Abbildung 5.66). Auf der Diagonalen ist für das Dimer kein Spot zu finden und Spot 1 befindet sich auf gleicher Höhe mit dem Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase (Spot 9 etwas unterhalb 669 kDa). Unterhalb von Spot 9 zeichnen sich auch einige Spots ab (2, 3, 4 und 11), die auf Subkomplexe der Chloroplasten-ATP-Synthase hinweisen. Die intensive F₁-Bande im Gelstreifen der ersten Dimension ist darauf zurückzuführen, dass die hierfür verwendete Chloroplastenprobe mehr als ein halbes Jahr bei -80 °C gelagert wurde und dadurch das Holoenzym der Chloroplasten-ATP-Synthase offensichtlich beeinträchtigt worden ist. Zusätzlich zu diesem lagerungsbedingten negativen Einfluss auf die CF₀F₁ führt die Wahl der relativ hohen Digitonin-Konzentration von 1,5 % (w/v) sowie die höhere Coomassie-Konzentration im Kathodenpuffer (0,02 % (w/v)) ebenfalls zur Destabilisierung. In Abbildung 5.67 sind die SDS-Gele gezeigt, die mit den nummerierten Spots des 2D-BN-Gels beladen worden sind. Die Gelstücke werden 30 min in 50 µL SDS-Auftragspuffer inkubiert und anschließend in die SDS-Geltaschen befördert. Zusätzlich pipettiert man 20 µL der jeweiligen Inkubationslösung zu den Gelstückchen.

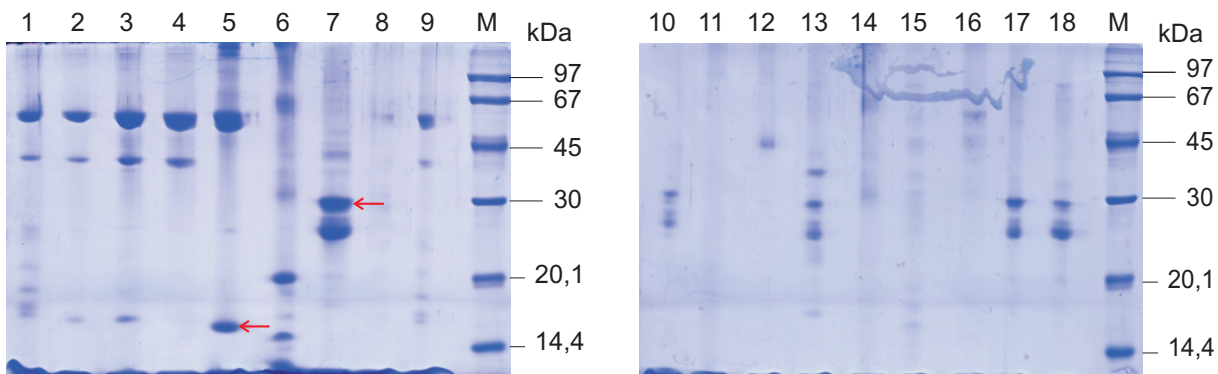


Abbildung 5.67: Auftrennung der in Abbildung 5.66 markierten Spots in der dritten Dimension (3D-SDS-PAGE, Mini-SDS-Gel). Die ausgestochenen Gelstückchen werden 30 min in 50 µL SDS-Auftragspuffer bei ZT inkubiert und im Anschluss daran in die Taschen eines Mini-SDS-Gels befördert. Zusätzlich werden die Gelstückchen in den Geltaschen mit 20 µL der entsprechenden Inkubationslösung versetzt. Die mit (M) bezeichneten Spuren enthält den Proteinstandard LMW. Nach der Elektrophorese werden die Gele Coomassie gefärbt. Die mit roten Pfeilen markierten Banden weisen auf massenspektrometrisch (MALDI-TOF) identifizierte UE von RuBisCO (Spur (5)) und LHCII (Spur (7)) hin.

Auffällig sind die intensiv gefärbten Banden in den Spuren (1–5) um ca. 50 kDa, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um die α - und β -Untereinheit der ATP-Synthase handelt. Hier kann gezeigt werden, dass Spot 1 ein Zerfallsprodukt des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase

sein muss, da die Proteinmuster der Spuren (2–4), bei denen es sich um Spots von CF_0F_1 -Zerfallsprodukten handelt, nahezu übereinstimmen. Zur Identifizierung der Proteinbanden aus den SDS-Gelen werden diese ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht (MALDI-TOF, durchgeführt von Eva R. Schäfer). Aus der Vielzahl an ausgestochenen Banden konnten allerdings nur die mit roten Pfeilen markierten Banden identifiziert werden. In Spur (5) handelt es sich um eine UE der RuBisCO (Chain I, Identitäts-Nummer: gi|16975084, Score 59) und in Spur (7) um eine UE des LHCII (chlorophyll *a/b* binding protein, Identitäts-Nummer: gi|15430554, Score 66). Es muss dazu gesagt werden, dass Scores ≥ 61 als signifikant gewertet werden. Somit kann eigentlich nur der in Spur (7) markierte Spot als identifiziert angesehen werden.

Auf Grund des offensichtlichen Fehlens des mitochondrialen ATP-Synthase-Dimers in der analysierten Chloroplastenprobe aus *C. reinhardtii* (Abbildungen 5.66 und 5.67), ist es notwendig für vergleichende Untersuchungen die Mitochondrienprobe aus dem selben Organismus auf vorhandene ATP-Synthasen zu überprüfen. Durch den isolierungsbedingten hohen Anteil an Chloroplasten in der Mitochondrienprobe sollten hier beide ATP-Synthase-Dimere zu finden sein. Hierzu werden zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten isolierte Mitochondrienproben (photomixotroph, 15.12.2006 und 10.09.2007, siehe Tabelle 5.1 auf Seite 74) mit $25 \text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll solubilisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt (BN-PAGE, hrCN-PAGE mit 0,02 % (w/v) Digitonin und 0,05 % (w/v) DOC im CN-Kathodenpuffer).

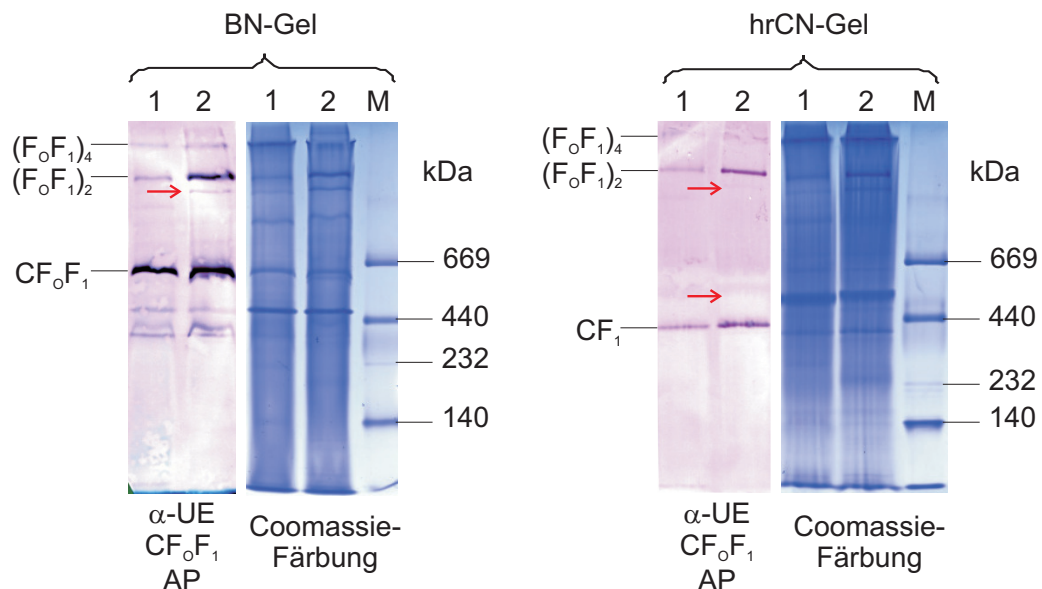


Abbildung 5.68: BN- und hrCN-PAGE (0,02 % (w/v) Digitonin und 0,05 % (w/v) DOC im CN-Kathodenpuffer) solubilisierter *C. reinhardtii*-Mitochondrien (Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnis 25 g g^{-1}). Es werden zwei zu unterschiedlichen Zeitpunkten isolierte Mitochondrienproben verwendet (Spur (1) 15.12.2006, Spur (2) 10.09.2007, siehe Tabelle 5.1 auf Seite 74). Nach der Elektrophorese wird mit je einem Teil des BN- und hrCN-Gels ein Western-Blot durchgeführt und die auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinkomplexe mit Antikörpern gegen die α -UE der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat gefärbt. Die zusätzlich mit dem Proteinstandard HMW (M) beladenen BN- und hrCN-Gelstreifen werden mit Coomassie gefärbt. Die roten Pfeile oben weisen auf schwache Banden des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase hin, der untere rote Pfeil auf das Chloroplasten-ATP-Synthase-Monomer.

Zum einen wird je ein Teil des BN- und des hrCN-Gels mit Coomassie gefärbt, zum anderen nach Immobilisierung der Proteinkomplexe per Western-Blot auf PVDF-Membranen eine immunologische Färbung mit Antikörpern gegen die α -UE der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.68 gezeigt. In beiden Gelsystemen erkennt man oligomere Formen der ATP-Synthase. Hier zeigt sich eine lagerungsbedingte Abnahme des ATP-Synthase-Dimers und -Monomers, die jeweils im BN-Gel in Spur (2), der jüngeren Probe, intensiver gefärbt werden als in Spur (1). Im hrCN-Gel erkennt man diesen Trend ebenfalls für das Dimer sowie für den F_1 -Teil. Die roten Pfeile oben in Abbildung 5.68 deuten auf eine Bande auf der PVDF-Membran hin, bei der es sich auf Grund der Antikörperfärbung um das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase handeln könnte. Allerdings reagiert diese Bande im *In-Gel*-Aktivitätstest auf Komplex I positiv (Daten nicht gezeigt), was vermuten lässt, dass es sich hierbei um eine unspezifische Antikörperfärbung handelt. Erstaunlicherweise scheint nur im BN-Gel das Monomer der Chloroplasten-ATP-Synthase stabil zu sein. Auf Höhe des unteren roten Pfeils im Coomassie gefärbten hrCN-Gel erkennt man eine intensiv gefärbte Bande, die auf der PVDF-Membran nicht gefärbt wird. Eigentlich stellt die hrCN-PAGE gegenüber der BN-PAGE die mildere Variante dar, sodass es hier nicht zum Zerfall des Monomers der Chloroplasten-ATP-Synthase kommen sollte. Allerdings kann hier nicht gesagt werden, ob es sich bei dieser Bande im Coomassie gefärbten hrCN-Gel um CF_0F_1 handelt, da diese Bande im Vergleich zur CF_0F_1 im BN-Gel etwas zu niedrig läuft. Eine versuchsweise Färbung der PVDF-Membranen mit Antikörpern gegen die α -UE der mitochondrialen ATP-Synthase aus Säugern verläuft negativ (Daten nicht gezeigt).

Da auch hier die nähere Charakterisierung des Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimers aus *C. reinhardtii* nicht gelungen ist, werden weiter Antikörpertests und *In-Gel*-Aktivitätstests mit Chloroplasten- und Mitochondrienproben durchgeführt, die jeweils photomixotroph bzw. photoautotroph kultiviert wurden (Präparationen vom 28.01.2010 und 02.02.2010, siehe Tabelle 5.1 auf Seite 74). Auf Grund der geringen Chlorophyllkonzentrationen der Chloroplasten und Mitochondrien der photoautotrophen Anzucht werden hier zur Solubilisierung Chlorophyll-Endkonzentrationen von $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$ für die Chloroplasten bzw. $0,14 \text{ mg mL}^{-1}$ für die Mitochondrien eingestellt. Für alle Proben wird zur Solubilisierung ein Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnis von 25 g g^{-1} verwendet. Abbildung 5.69 zeigt das Ergebnis der BN-gelelektrophoretischen Auftrennung ($T = 3\text{--}11 \%$). Hier ist das direkt nach der Elektrophorese dokumentierte, das mit Coomassie gefärbte und das in Komplex-V-Aktivitätstestlösung (vor und nach PbS-Fällung) inkubierte Gel gezeigt. Wie bereits die niedrige Chlorophyllkonzentration in der photoautotroph kultivierten Mitochondrienprobe vermuten lässt, sind hier im direkt nach der Elektrophorese dokumentierten BN-Gel keine grünen Banden zu erkennen, die auf Proteinkomplexe des Photosyntheseapparates zurückzuführen wären (Spur (4) links in Abbildung 5.69). Dementsprechend handelt es sich hierbei um eine Mitochondrienprobe, die nahezu frei von Chloroplasten zu sein scheint. In allen vier Solubilisaten werden ATP-Hydrolyse-aktive Banden festgestellt, die auf das mitochondriale ATP-Synthase-Dimer V_2 zurückzuführen sind. Besonders intensiv wird diese Bande für die photomixotroph angezogene Mitochondrienprobe gefärbt (Spur (3) rechts in Abbildung 5.69).

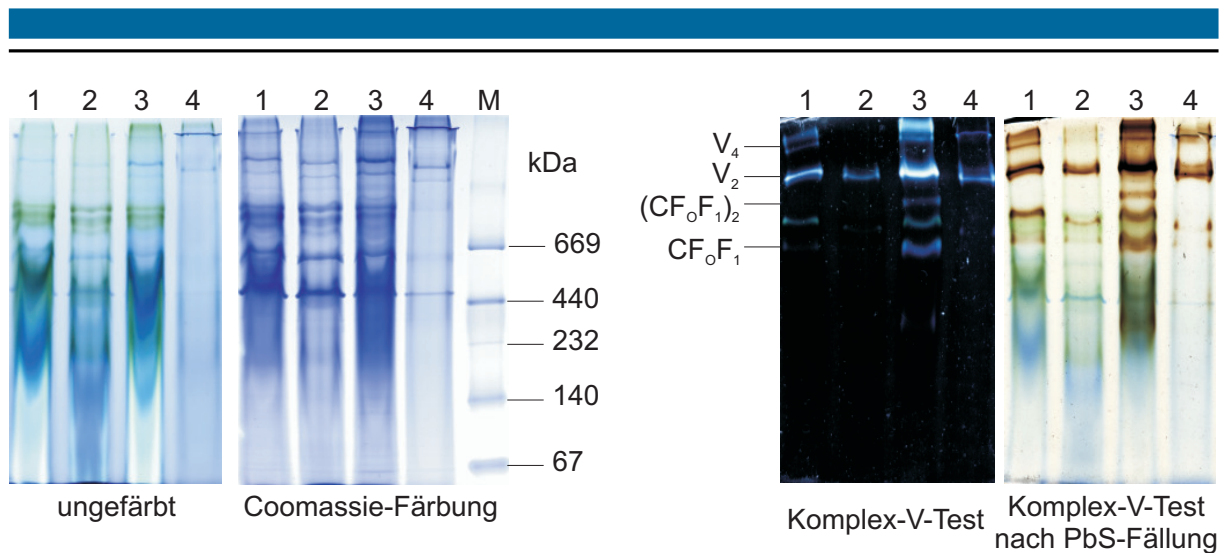


Abbildung 5.69: BN-PAGE ($T=3-11\%$) solubilisierter *C. reinhardtii*-Organellen. Die Spuren (1) und (2) enthalten Chloroplasten einer photomixotrophen bzw. photoautotrophen Anzucht, die Spuren (3) und (4) Mitochondrien entsprechend kultivierter *C. reinhardtii*-Zellen. Die Solubilisierung wird mit $25\text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll durchgeführt und für die photomixotrophe Probe eine Chlorophyll-Endkonzentration von $0,4\text{ mg mL}^{-1}$ eingestellt. Die Solubilisierungsansätze für die photoautotroph kultivierten Zellen werden auf Chlorophyll-Endkonzentrationen von $0,3\text{ mg mL}^{-1}$ für die Chloroplasten und $0,14\text{ mg mL}^{-1}$ für die Mitochondrien verdünnt. Links ist das direkt nach der Elektrophorese dokumentierte sowie das Coomassie gefärbte BN-Gel gezeigt. In Spur (M) ist der Proteinstandard HMW enthalten. Rechts ist das BN-Gel nach Inkubation in Komplex-V-Testlösung vor und nach PbS-Fällung gezeigt. Der Test beruht auf der Hydrolyse von ATP durch ATP-Synthasen.

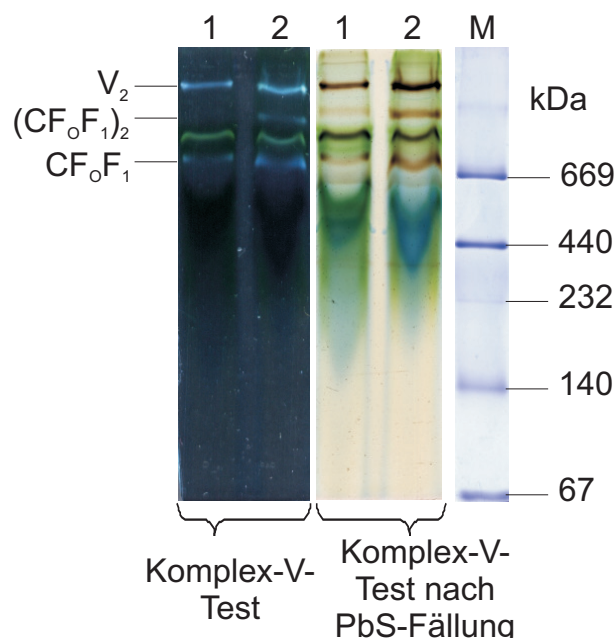


Abbildung 5.70: BN-PAGE ($T=3-12\%$) solubilisierter *C. reinhardtii*-Organellen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte photomixotroph. Spur (1) wird mit $40\text{ }\mu\text{L}$ Chloroplastensolubilisat beladen, Spur (2) mit dem gleichen Volumen an Mitochondriensolubilisat. Die Solubilisierung wird mit $25\text{ g Digitonin g}^{-1}$ Chlorophyll bei einer Chlorophyll-Endkonzentration von $0,4\text{ mg mL}^{-1}$ durchgeführt. In Spur (M) ist der Coomassie gefärbte Referenzstreifen mit dem Proteinstandard HMW gezeigt. Dargestellt sind die mit Solubilisat beladenen BN-Gelstreifen nach Inkubation in Komplex-V-Testlösung vor und nach PbS-Fällung.

Nur in dieser Spur kann eine zusätzliche Bande ausgemacht werden, bei der es sich vermutlich um das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase handelt. Auch nach anschließender Umsetzung des Bleiphosphates mit Ammoniumsulfid zu Bleisulfid kann nur für diese photomixotrophe Mitochondrienprobe die $(CF_0F_1)_2$ -Bande festgestellt werden. Weiterhin sind vor allem für beide Mitochondrienproben und die photomixotrophe Chloroplastenprobe im hochmolekularen Bereich Banden auszumachen (Spuren (1), (3) und (4)), die ein Hinweis auf die tetramere Form der mitochondrialen ATP-Synthase sind.

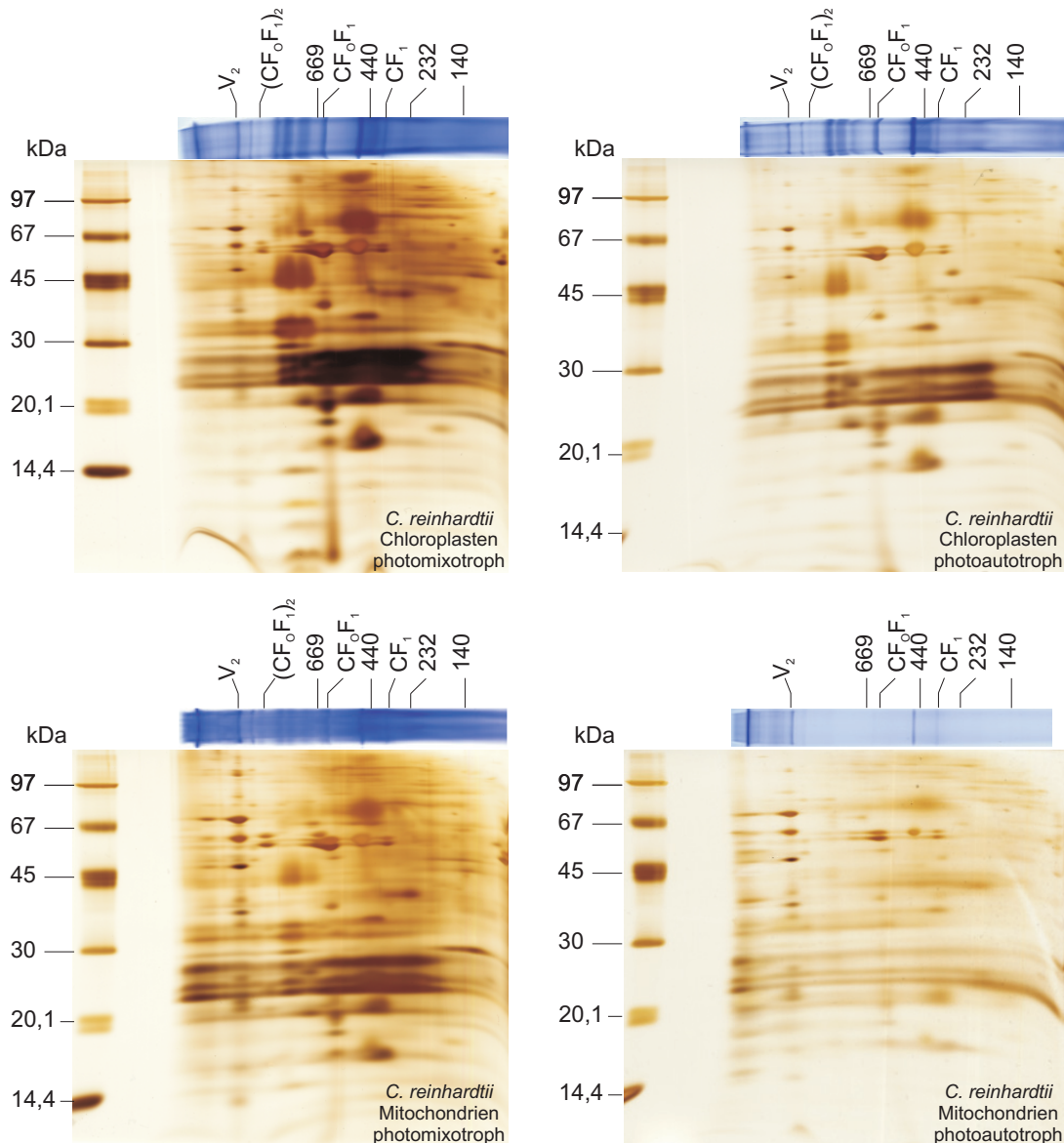


Abbildung 5.71: 2D-Tricine-SDS-PAGE solubilisierter *C. reinhardtii*-Organellen (Kultivierung der Zellen photomixotroph und photoautotroph). Die jeweiligen BN-Gelstreifen der ersten Dimension (siehe Coomassie gefärbtes BN-Gel in Abbildung 5.69) werden vor der denaturierenden Auftrennung in der zweiten Dimension 1 h bei ZT in einer Lösung aus 1 % (w/v) SDS und 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol inkubiert. Nach der Elektrophorese werden die Gele Silber gefärbt.

Offensichtlich erleichtert der hier verwendete, weniger steile Gradient an T (3–11 %) das Einlaufen dieser hochmolekularen Proteinkomplexe. Vergleicht man hierzu ein BN-Gel mit einem

Gradienten an T von 3–12 %, das mit photomixotroph kultivierten, solubilisierten Organellen aus *C. reinhardtii* der gleichen Präparation beladen worden ist, so werden hier keine V_4 -Banden gefunden (Abbildung 5.70). Das BN-Gel wird mit deutlich mehr Probe beladen (40 μL Solubilisat pro Spur gegenüber 25 μL in Abbildung 5.69), was dazu führt, dass hier für die Chloroplasten- und die Mitochondrienprobe die Bande des Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimers gefunden wird. Auffällig ist hierbei, dass der Anteil an $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$ und an CF_0F_1 in der Mitochondrienprobe größer ist als in der Chloroplastenprobe. Im Prinzip wurde dieses Ergebnis bereits im BN-Gel aus Abbildung 5.69 erhalten, nur dass hier die aufgetragene Chloroplastenmenge für den Nachweis von $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$ zu gering war. Eine gelelektrophoretische Auftrennung unter denaturierenden Bedingungen der Organellen aus unterschiedlich kultivierten *C. reinhardtii*-Zellen in der zweiten Dimension verdeutlicht die erhaltenen Ergebnisse bezüglich des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase (Abbildung 5.71). Im photoautotroph angezogenen Organismus findet man in der Chloroplastenprobe sehr wenig $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$, in der Mitochondrienprobe noch weniger bis gar nichts. Die Kultivierung unter photomixotrophen Bedingungen führt zu einer Erhöhung des Anteils an Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimer in beiden Organellen, wobei der Anteil in der Mitochondrienprobe größer ist. In Bezug auf die Abnahme des Dimers in Chloroplasten bei Kultivierung unter photoautotrophen Bedingungen stimmen die hier erhaltenen Ergebnisse mit denen von Schwassmann *et al.* (2007)^[101] überein.

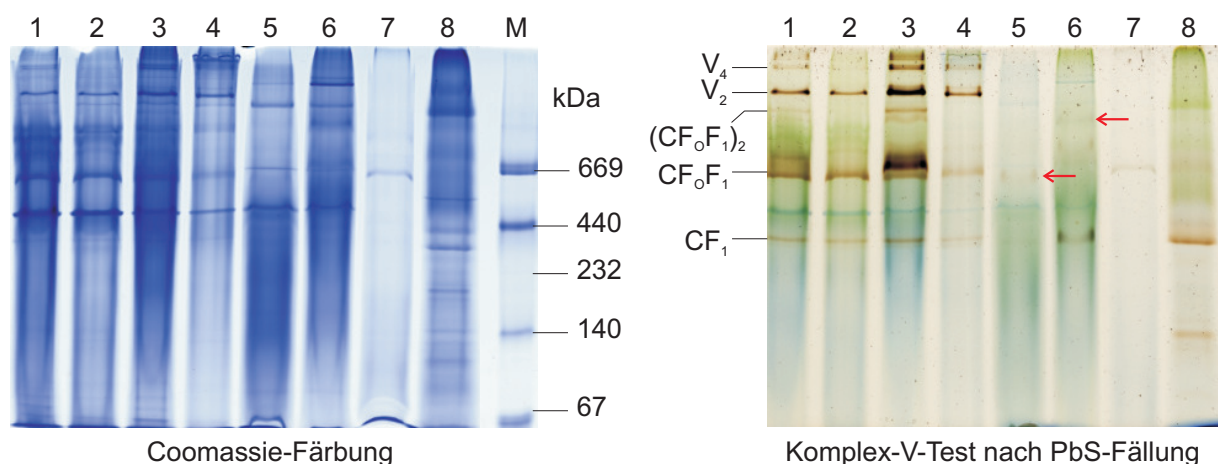


Abbildung 5.72: BN-PAGE mit solubilisierten Chloroplasten und Mitochondrien aus unterschiedlichen Organismen. Die Spuren sind wie folgt beladen: Spur (1) Chloroplasten, 0,4 mg mL⁻¹, photomixotroph, *C. reinhardtii*; Spur (2) Chloroplasten, 0,3 mg mL⁻¹, photoautotroph, *C. reinhardtii*; Spur (3) Mitochondrien, 0,4 mg mL⁻¹, photomixotroph, *C. reinhardtii*; Spur (4) Mitochondrien, 0,14 mg mL⁻¹, photoautotroph, *C. reinhardtii*; Spur (5) Chloroplasten, 0,4 mg mL⁻¹, *E. gracilis*; Spur (6) Mitochondrien, 0,4 mg mL⁻¹, *E. gracilis*; Spur (7) Mitochondrien, 0,8 mg mL⁻¹, *A. longa*; Spur (8) Thylakoide, 0,2 mg mL⁻¹, *N. muscorum*. Die Solubilisierungen werden mit Digitonin bei einem Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis von 25 g g⁻¹ durchgeführt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um Chlorophyll-Endkonzentrationen. Nur für *A. longa* ist die Proteinkonzentration angegeben sowie das zur Solubilisierung eingestellte Detergens-zu-Protein-Verhältnis von 6 g g⁻¹. Pro Spur werden 20 μL Solubilisat aufgetragen. Das Coomassie gefärbte Bild ist links gezeigt (Spur (M) enthält den Proteinstandard HMW). Das Ergebnis nach Inkubation in Komplex-V-Testpuffer ist rechts dargestellt. Die roten Pfeile deuten auf schwach gefärbte Banden, die ein Hinweis auf CF_0F_1 (Spur (5)) bzw. $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$ (Spur (6)) in *E. gracilis* sind.

Neben Untersuchungen zum Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *C. reinhardtii* werden vergleichend ATP-Synthasen aus anderen Organismen mittels *In-Gel*-Aktivitätstests und Antikörperfärbung sichtbar gemacht. In Abbildung 5.72 sind zwei BN-Gele gezeigt, die mit solubilierten Chloroplasten und Mitochondrien aus unterschiedlichen Organismen beladen worden sind. Ein Gel wird mit Coomassie gefärbt und das andere in Komplex-V-Testpuffer inkubiert (ATP-Hydrolyse). Die aufgetragenen Solubilisate aus *C. reinhardtii*-Organellen zeigen nach Inkubation in Komplex-V-Testpuffer die gleichen Hydrolyse-aktiven Banden wie im BN-Gel in Abbildung 5.69. Diese Proben (Spuren (1–4)) dienen hier somit als Referenzproben zur Lokalisierung von ATP-Synthasen in den Organellen aus *E. gracilis*, *A. longa* und *N. muscorum*. Es ist auffällig, dass sich nur in den Spuren (1–4) oligomere Formen der ATP-Synthase deutlich abzeichnen. In der Mitochondrienprobe aus *E. gracilis* findet man eine schwach gefärbte Bande, die auf ähnlicher Höhe wie $(CF_0F_1)_2$ läuft (Spur (6), roter Pfeil in Abbildung 5.72).

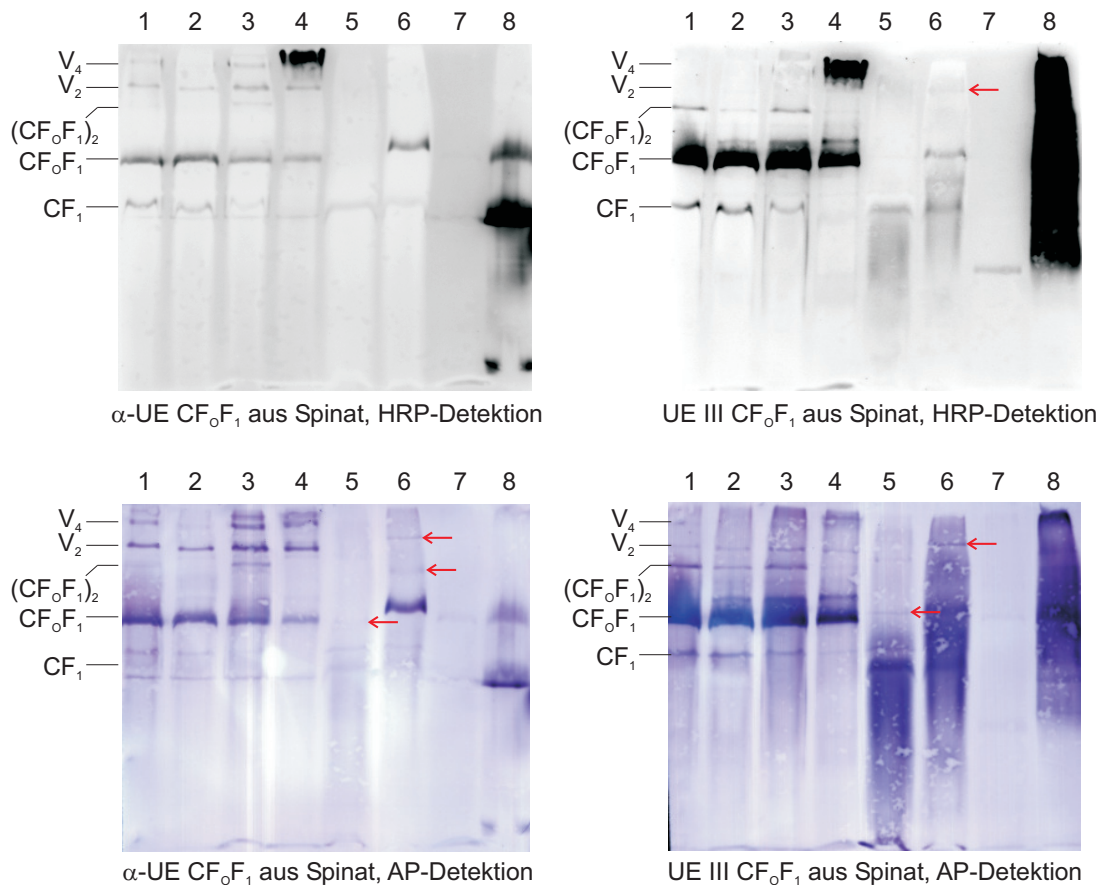


Abbildung 5.73: Western-Blots solubilisierter Organellen aus den Organismen *C. reinhardtii*, *E. gracilis*, *A. longa* und *N. muscorum*, die in Lösungen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten α bzw. III der CF_0F_1 aus Spinat inkubiert werden. Die Beladung der geblotteten BN-Gele ist identisch mit der Gel-Beladung aus Abbildung 5.72. Oben sind die mittels Horseradish peroxidase (HRP) detektierten Blotmembranen gezeigt, unten die nach Entfernen gebundener Antikörper und erneuter Inkubation in den entsprechenden Antikörperlösungen mittels alkalischer Phosphatase (AP) detektierten. Die roten Pfeile weisen auf CF_0F_1 und verschiedene dimere ATP-Synthasen (mitochondrial und aus Chloroplasten) aus Organellen von *E. gracilis* hin.

Für Chloroplasten aus *E. gracilis* (roter Pfeil in Spur (5) in Abbildung 5.72) sowie für die Solubilisate aus *A. longa* und *N. muscorum* (Spuren (7–8)) können nur schwach gefärbte Banden festgestellt werden, die ähnlich weit wie CF_0F_1 aus *C. reinhardtii* im BN-Gel migrieren. Allerdings findet man in den Spuren (6) und (8) intensiver gefärbte Banden, bei denen es sich um F_1 -Teile der jeweiligen ATP-Synthasen handelt. Diese Tatsache kann ein Hinweis darauf sein, dass mögliche dimere Formen von ATP-Synthasen aus *E. gracilis* und *N. muscorum* weniger stabil als aus *C. reinhardtii* sind. Die Möglichkeit, dass die Hydrolyse von ATP inhibiert wird und es somit zu keiner Bandenfärbung durch den Enzymtest kommt, ist eher unwahrscheinlich, da die entsprechenden Spuren im Coomassie gefärbten BN-Gel auf Höhe von V_2 aus *C. reinhardtii* keine Banden aufweisen. Zur Überprüfung der erhaltenen Ergebnisse werden BN-Gele identisch zu den BN-Gelen aus Abbildung 5.72 beladen und nach der Elektrophorese die auf PVDF-Membranen immobilisierten Proteinkomplexe in Lösungen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten α bzw. III der CF_0F_1 aus Spinat inkubiert. Die Detektion erfolgt zuerst mit Hilfe des HRP-Systems und nach Entfernung gebundener Antikörper und erneuter Inkubation in den entsprechenden Antikörperlösungen über das AP-System. Abbildung 5.73 zeigt die PVDF-Membranen nach den entsprechenden Antikörperdetektionen. Für die mit Antikörpern gegen die α -UE der ATP-Synthase inkubierten Membranen stellt man fest, dass nach HRP-Detektion oligomere Formen mitochondrialer ATP-Synthasen sowie CF_0F_1 und in geringem Maße auch CF_1 sichtbar gemacht werden (Abbildung 5.73 links oben). Wie bereits in Abbildung 5.72 nach Inkubierung in Komplex-V-Testpuffer gezeigt werden konnte, weisen nach Antikörperfärbung wieder nur die solubilisierten *C. reinhardtii*-Organellen deutlich sichtbare Banden auf (Spuren (1–4) in Abbildung 5.73). Für *E. gracilis* wird nach HRP-Detektion der α -UE von CF_0F_1 nur in der Mitochondrienprobe eine Bande für das Monomer der ATP-Synthase gefärbt (Spur (6)). Die Chloroplastenprobe zeigt hier keine Bande, dafür werden für beide *E. gracilis*-Organellen F_1 -Teile gefärbt (Spuren (5) und (6)). Für *A. longa* und *N. muscorum* ist ähnliches festzustellen. Auch hier werden lediglich ATP-Synthase-Monomere und F_1 -Teile sichtbar. Die Färbung der jeweiligen Banden ist bei *N. muscorum* allerdings deutlich intensiver als bei *A. longa* (Spuren (7) und (8)).

Die Färbung der Blotmembran mit Antikörpern gegen die UE III der Chloroplasten-ATP-Synthase zeigt im Vergleich zur Markierung mit Antikörpern gegen die α -UE der Chloroplasten-ATP-Synthase Unterschiede auf (Abbildung 5.73 rechts oben). Zum einen werden die mitochondrialen ATP-Synthasen V_2 und V_4 in den Spuren (1–3) nicht gefärbt, zum anderen erkennt man in den Spuren (1–4) eine zum Teil deutliche Färbung des Dimers der Chloroplasten-ATP-Synthase. In Spur (6) ist relativ schwach eine Bande auszumachen, die ein Hinweis auf V_2 aus *E. gracilis* ist (roter Pfeil in Abbildung 5.73 rechts oben). Für *A. longa* kann mit Antikörpern gegen die UE III der CF_0F_1 keine intakte ATP-Synthase markiert werden, sondern lediglich der F_0 -Teil (Spur (7)). Für solubilisierete Thylakoide aus *N. muscorum* zeigt der hier verwendete Antikörper keine spezifische Reaktion (verschmierte Bande über den Großteil von Spur (8)). Es werden neben den beschriebenen Unterschieden allerdings auch Gemeinsamkeiten festgestellt. Wie mit Antikörpern gegen die α -UE der ATP-Synthase werden auch mit Antikörpern gegen die UE III intensiv CF_0F_1 - und CF_1 -Banden gefärbt. Anders als für die Proben aus *C. reinhardtii*

tii-Organellen (Spuren (1–4)) ist das ATP-Synthase-Monomer aus *E. gracilis* im Vergleich zur Markierung mit Antikörpern gegen die α -UE weniger intensiv gefärbt. Die mit Hilfe des HRP-Systems detektierten Antikörper werden mit Roti[®]-Free von den Membranen entfernt (30 min bei ca. 60 °C unter Schütteln im Wasserbad, anschließend zweimal je 20 min in PBST (1x) waschen) und erneut mit den selben Erstantikörperlösungen inkubiert. Die Detektion erfolgt hier über das AP-System (Abbildung 5.73 unten). Prinzipiell erhält man das gleiche Ergebnis im Vergleich zur HRP-Detektion. Allerdings erkennt man hier schwach gefärbte Banden für das Monomer der ATP-Synthase für beide *E. gracilis*-Organellen (rote Pfeile links und rechts unten in Abbildung 5.73). Außerdem kann mit Antikörpern gegen die α -UE in Spur (6) eine weitere Bande zwischen V_2 und CF_0F_1 detektiert werden, bei der es sich wahrscheinlich um das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *E. gracilis* handelt.

Erstaunlich ist die Tatsache, dass mit Antikörpern gegen die UE III der Chloroplasten-ATP-Synthase das Dimer der CF_0F_1 besser detektiert werden kann als mit Antikörpern gegen die α -UE der Chloroplasten-ATP-Synthase. Erwarten würde man wie beim Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase, dass ein gegen die α -UE gerichteter Antikörper leichteren Zugang zum entsprechenden Antigen haben sollte, als ein gegen die UE III gerichteter. Diese Theorie kann für die oligomeren Formen der mitochondrialen ATP-Synthasen aus *C. reinhardtii* bestätigt werden. Für das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase allerdings nicht. Auch das Dimer der mitochondrialen ATP-Synthase aus *E. gracilis* kann mit Antikörpern gegen die UE III detektiert werden, mit Antikörpern gegen die α -UE nicht. Diese Beobachtungen sind ein Hinweis darauf, dass es strukturelle Unterschiede zwischen dem mitochondrialen und dem Chloroplasten-ATP-Synthase-Dimer aus *C. reinhardtii* bzw. auch Unterschiede zwischen V_2 aus *E. gracilis* und *C. reinhardtii* gibt.

Zusätzlich zu den verwendeten Antikörpern gegen die Untereinheiten α und III werden solubilisierter Proteinkomplexe aus *C. reinhardtii* und *E. gracilis* auf Blotmembranen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten I, II, IV und ϵ der Chloroplasten-ATP-Synthase aus Spinat gefärbt. Die Detektion erfolgt mit Hilfe des HRP-Systems. In Abbildung 5.74 sind die Ergebnisse der Antikörperfärbung gegen die Untereinheiten ϵ , I und IV gezeigt. Das Ergebnis der Färbung mit Antikörpern gegen die UE II ist in Abbildung 5.74 nicht gezeigt, da hier in keiner der 5 Spuren Banden detektiert werden konnten.

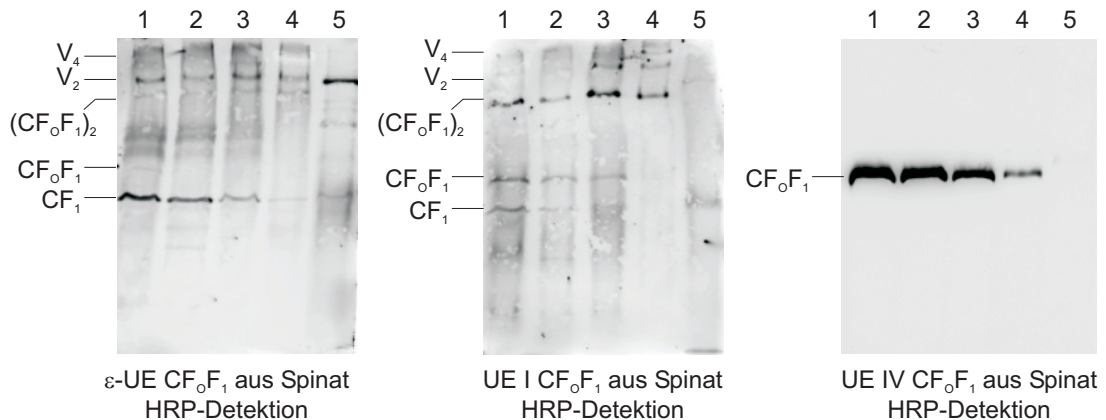


Abbildung 5.74: Western-Blots solubilisierter Organellen aus den Organismen *C. reinhardtii* und *E. gracilis*, die in Lösungen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten ϵ , I und IV der CF_0F_1 aus Spinat inkubiert werden. Die Spuren (1–4) der geblotteten BN-Gele wurden mit solubilierten Chloroplasten und Mitochondrien aus photomixotrophen und photoautotrophen *C. reinhardtii*-Kultivierungen beladen (vergleiche Beladung der Spuren (1–4) in Abbildung 5.72). Spur (5) des geblotteten BN-Gels enthält solubilierte Mitochondrien aus *E. gracilis* (vergleiche Beladung von Spur (6) in Abbildung 5.72). Die Detektion erfolgt über das Horseradish-peroxidase-System (HRP).

Die meisten Banden können nach Färbung mit Antikörpern gegen die Untereinheiten ϵ und I detektiert werden. Mit Antikörpern gegen die UE IV wird lediglich CF_0F_1 intensiv für *C. reinhardtii* und schwach für *E. gracilis* gefärbt. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass die UE IV in diesen beiden Organismen nicht außen mit UE III assoziiert ist, sondern sich wie bei Spinat^[111] innerhalb des membranintegralen Rings (III-Oligomer) befindet. Bezüglich oligomerer Formen von ATP-Synthasen werden mit Antikörpern gegen die ϵ -UE verstärkt die mitochondrialen ATP-Synthasen V_2 und V_4 detektiert, das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase dagegen kaum. Im Unterschied dazu detektiert man mit Antikörpern gegen die UE I oligomere Formen mitochondrialer ATP-Synthasen nur vermindert, $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$ dagegen wird intensiv gefärbt (Spuren (1–4) Abbildung 5.74 Mitte). Ähnliche Ergebnisse wurden bei den Antikörperfärbungen gegen die Untereinheiten α und III erhalten. Folgende Hypothese könnte die erhaltenen Ergebnisse erklären. Befänden sich die äußeren Stiele (UE I und II) des ATP-Synthase-Dimers im Inneren zwischen beiden Enzymkomplexen, so wäre der Zugang zu den Untereinheiten III und I für entsprechende Antikörper erschwert. Für mitochondriale ATP-Synthase-Dimere findet man diese Anordnung der äußeren Stiele innen zwischen beiden ATP-Synthasen^[37,106]. Lägen die äußeren Stiele nun aber nicht innen zwischen beiden ATP-Synthasen sondern außen, so wäre der Zugang zu den besagten Untereinheiten für entsprechende Antikörper weniger gehindert. Eine solche Anordnung für das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase könnte die erhaltenen Ergebnisse der Antikörperfärbungen in den Abbildungen 5.73 und 5.74 erklären.

Zur Vervollständigung der durchgeführten Experimente werden die Solubilisate von Organellen aus verschiedenen Organismen mittels hrCN-PAGE (0,05 % (w/v) TDOC, 0,02 % (w/v) DDM im CN-Kathodenpuffer) aufgetrennt und auf ATP-Hydrolyse (Komplex-V-Aktivitätstest) hin bzw. immunologisch untersucht. Für die hrCN-PAGE wird ein weniger steiler Gradient an T gewählt (3,5–11 %), um eine bessere Trennung von Proteinkomplexen ähnlicher Massen zu erhalten.

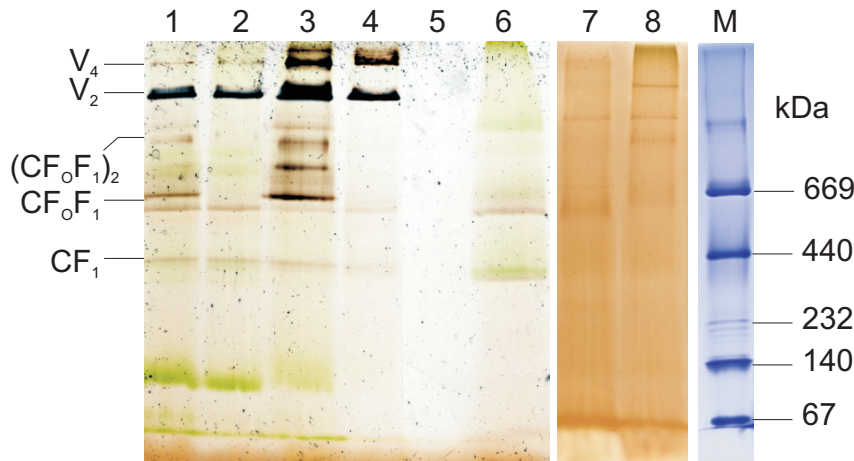


Abbildung 5.75: hrCN-PAGE mit solubilisierten Chloroplasten und Mitochondrien aus unterschiedlichen Organismen. Die Spuren sind wie folgt beladen: Spur (1) Chloroplasten, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, photomixotroph, *C. reinhardtii*; Spur (2) Chloroplasten, $0,3 \text{ mg mL}^{-1}$, photoautotroph, *C. reinhardtii*; Spur (3) Mitochondrien, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, photomixotroph, *C. reinhardtii*; Spur (4) Mitochondrien, $0,14 \text{ mg mL}^{-1}$, photoautotroph, *C. reinhardtii*; Spur (5) Mitochondrien, $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$, *A. longa*; Spur (6) Thylakoide, $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, *N. muscorum*; Spur (7) Chloroplasten, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, *E. gracilis*; Spur (8) Mitochondrien, $0,4 \text{ mg mL}^{-1}$, *E. gracilis*; . Die Solubilisierungen werden mit Digitonin bei einem Detergens-zu-Chlorophyll-Verhältnis von 25 g g^{-1} durchgeführt. Bei den angegebenen Konzentrationen handelt es sich um Chlorophyll-Endkonzentrationen. Nur für *A. longa* ist die Proteinkonzentration angegeben sowie das zur Solubilisierung eingestellte Detergens-zu-Protein-Verhältnis von 6 g g^{-1} . Pro Spur werden $20 \mu\text{L}$ Solubilisat aufgetragen. Hier ist das Ergebnis nach Inkubation in Komplex-V-Testpuffer dargestellt. Bei Spur (M) handelt es sich um einen mit Coomassie gefärbten Referenzstreifen des Proteinstandards HMW.

Abbildung 5.75 zeigt das Ergebnis des in Komplex-V-Testpuffer inkubierten hrCN-Gels. Das Ergebnis der ATP-Hydrolyse-Reaktion im hrCN-Gel ist ähnlich zu dem im BN-Gel erhaltenen (Abbildung 5.72). Für *A. longa* werden keine ATP-Synthase-Banden gefärbt und für *N. muscorum* erkennt man lediglich eine Bande für das ATP-Synthase-Monomer (Spuren (5) und (6)). In den Spuren (1–4) werden sowohl mitochondriale als auch Chloroplasten-ATP-Synthase-Oligomere gefärbt. Auch hier ist der höhere Anteil an $(CF_0F_1)_2$ in beiden Organellen aus photomixotroph kultivierten Zellen gut zu erkennen (Spuren (1) und (3)). Im Unterschied zum Aktivitätstest im BN-Gel (siehe Abbildung 5.72) werden im hrCN-Gel in den mit solubilisierten *E. gracilis*-Organellen beladenen Spuren Banden für mitochondriale ATP-Synthase-Oligomere gefärbt (Spuren (7) und (8)). In Spur (8) zeichnet sich zusätzlich noch eine weniger intensiv gefärbte Bande ab, bei der es sich vermutlich um das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase handelt. Für immunologische Untersuchungen werden hrCN-Gele mit solubilisierten Organellen aus *C. reinhardtii* und Mitochondrien aus *E. gracilis* beladen und nach der Elektrophorese die Proteinkomplexe per Western-Blot auf PVDF-Membranen transferiert. Die Blotmembranen werden in Lösungen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten α , β , ϵ , I, II, III und IV der Spinat-ATP-Synthase inkubiert. Die mittels HRP detektierten Antikörper der Blotmembranen sind in Abbildung 5.76 gezeigt (Daten für β , II und IV nicht gezeigt wegen ähnlicher oder keiner Reaktivität).

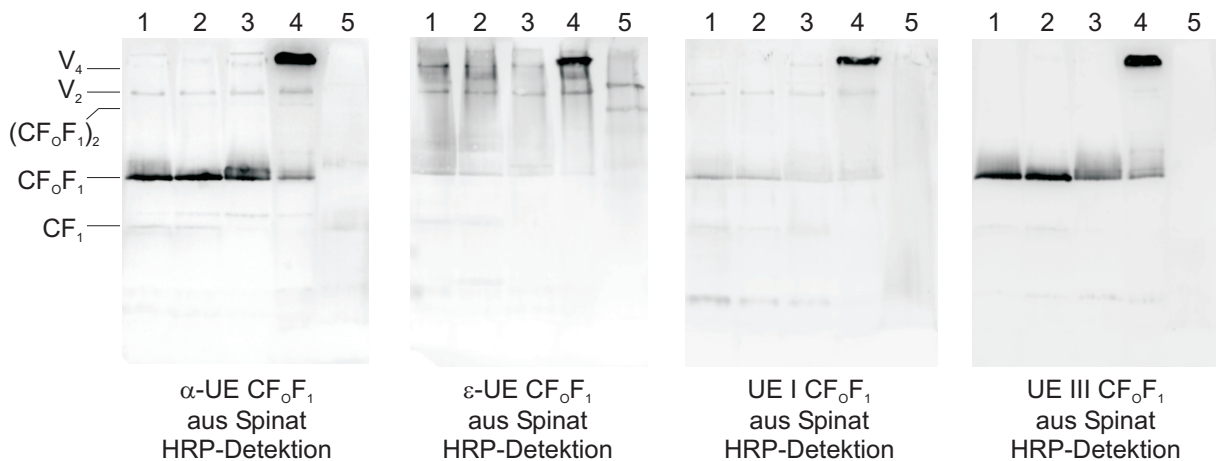


Abbildung 5.76: Western-Blots solubilisierter Organellen aus den Organismen *C. reinhardtii* und *E. gracilis* die in Lösungen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten α , ϵ , I und III der CF_0F_1 aus Spinat inkubiert werden. Die Spuren (1–4) der geblotteten hrCN-Gele wurden mit solubilisierten Chloroplasten und Mitochondrien aus photomixotrophen und photoautotrophen *C. reinhardtii*-Kultivierungen beladen (vergleiche Beladung der Spuren (1–4) in Abbildung 5.75). Die Spur (5) des geblotteten hrCN-Gels enthält solubilierte Mitochondrien aus *E. gracilis* (vergleiche Beladung von Spur (8) in Abbildung 5.75). Die Detektion erfolgt über das Horseradish-peroxidase-System (HRP).

Mit allen hier eingesetzten Antikörpern kann das ATP-Synthase-Monomer identifiziert werden. Die mit *C. reinhardtii*-Proben beladenen Spuren (1–4) zeigen hier eine intensiv gefärbte Bande. Die entsprechende Bande für *E. gracilis*-Mitochondrien wird dagegen nur relativ schwach gefärbt, und das auch nur für die mit Antikörpern gegen die Untereinheiten α und ϵ markierten Blotmembranen. Für die anderen Antikörper zeigt sich hier nahezu keine Reaktivität. Allerdings kann mit dem Antikörper gegen die UE ϵ , wie auch schon aus dem geblotteten BN-Gel in Abbildung 5.74, Spur (5), eine gut sichtbare Bande für V_2 aus *E. gracilis* detektiert werden. Zusätzlich wird hier auch noch das Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *E. gracilis* gefärbt (Spur (5) in Abbildung 5.76). Das entsprechende Dimer der Chloroplasten-ATP-Synthase aus *C. reinhardtii* kann allerdings nur mit Antikörpern gegen die α -UE sehr schwach gefärbt werden. Die gemachten Beobachtungen bezüglich der unterschiedlichen Antikörperreaktivitäten von V_2 und $(\text{CF}_0\text{F}_1)_2$ für *C. reinhardtii* in Abbildung 5.74 können mit den per hrCN-PAGE aufgetrennten und auf PVDF-Membranen geblotteten Proteinkomplexen nicht gemacht werden.

5.6.2 Mitochondriale Proteinkomplexe

Neben den in Kapitel 5.6.1 diskutierten Ergebnissen zur Charakterisierung von ATP-Synthasen aus verschiedenen Organismen werden mit den beschriebenen Methoden weitere mitochondriale Proteine aus diesen detektiert und miteinander verglichen. Mit Hilfe von *In-Gel*-Aktivitätstests konnten in Abschnitt 5.4 bereits für *C. reinhardtii*- und *E. gracilis*-Proben Proteinsuperkomplexe nachgewiesen werden. Abbildung 5.77 zeigt zusätzlich zu diesen beiden Organismen vergleichend das Ergebnis eines *In-Gel*-Aktivitätstests mit *A. longa*.

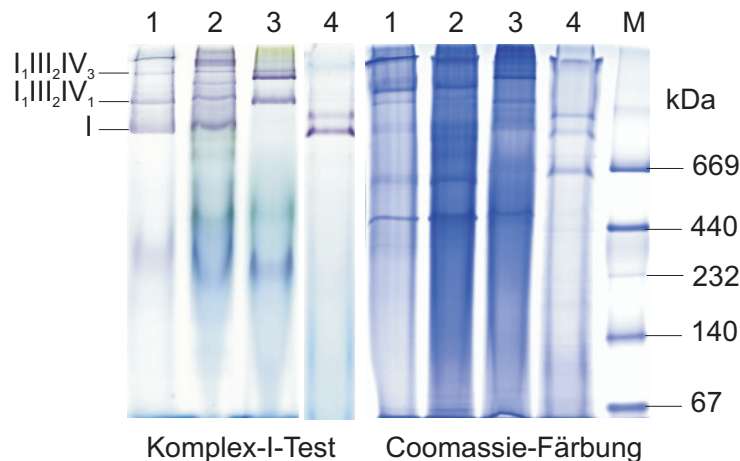


Abbildung 5.77: BN-PAGE mit Solubilisaten verschiedener Organismen. Die Spuren (1) und (2) sind mit solubilisierten Mitochondrien einer photoautotrophen bzw. photomixotrophen *C. reinhardtii*-Kultur beladen. Die Spuren (3) und (4) enthalten solubilierte *E. gracilis*- bzw. *A. longa*-Mitochondrien. Die Solubilisierungen werden für *C. reinhardtii*- und *E. gracilis*-Mitochondrien mit 25 g Digitonin g⁻¹ Chlorophyll bei Chlorophyll-Endkonzentrationen von 0,4 mg mL⁻¹ bzw. 0,14 mg mL⁻¹ für die photomixotroph angezogene *C. reinhardtii*-Kultur durchgeführt, für *A. longa*-Mitochondrien mit 6 g Digitonin g⁻¹ Protein und 0,8 mg mL⁻¹ Protein-Endkonzentration. Links ist der Teil des BN-Gels nach Inkubation in Komplex-I-Testpuffer gezeigt, rechts der Coomassie gefärbte Teil, der eine zusätzliche Spur (M) mit dem Proteinstandard HMW enthält.

Im Unterschied zur photoautotrophen Mitochondrien-Probe aus *C. reinhardtii* (Abbildung 5.77, Spur (1)) zeigen sich für die photomixotrophe Probe (Spur (2)) deutlich mehr Komplex-I-enthaltende Superkomplexe im hohen Massenbereich. Es könnte sich hierbei um einen kultivierungsbedingten Einfluss handeln, allerdings begründet der große Konzentrationsunterschied zwischen beiden Proben (photoautotroph 0,14 mg mL⁻¹, photomixotroph 0,4 mg mL⁻¹) eher das Fehlen von Superkomplexbanden auf dem BN-Gel im Bereich hoher Molekularmassen. Das Monomer von Komplex I kann für beide *C. reinhardtii*-Proben detektiert werden. Die mit solubilisierten *E. gracilis*-Mitochondrien beladene Spur (3) zeigt mindestens drei Komplex-I-enthaltende Superkomplexe, S_{klein}, S_{groß} sowie direkt oberhalb dieses eine weitere sehr schmale Superkomplexbande. Bei der *A. longa*-Probe (Spur (4)) werden nach Inkubation in Komplex-I-Testlösung zwei NADH-Dehydrogenase-enthaltende Banden gefärbt, die auf das Komplex-I-Monomer sowie einen Komplex-I-enthaltenden Superkomplex zurückzuführen sind. In Bezug auf die Molekularmasse für das Komplex-I-Monomer ist kein Unterschied zwischen *A. longa*- und *C. reinhardtii*-Mitochondrien festzustellen. Allerdings unterscheiden sich der kleinste

Superkomplex aus *C. reinhardtii* ($I_1III_2IV_1$) und der *A. longa*-Superkomplex bezüglich der Zusammensetzung, da hier ein deutlicher Massenunterschied zu verzeichnen ist. Festzuhalten ist die bemerkenswerte Tatsache, dass trotz der Verwandtschaft zwischen *A. longa* und *E. gracilis* für letzteren Organismus kein Komplex-I-Monomer gefunden werden kann.

Zur näheren Charakterisierung der Superkomplexe aus den betrachteten Organismen werden zusätzlich *In-Gel*-Aktivitätstests für Komplex IV sowie Antikörpertests durchgeführt. In Abbildung 5.78 sind die Ergebnisse eines Komplex-IV-Tests in BN-Gelen für Mitochondrien aus *C. reinhardtii* und *A. longa* gezeigt. Entgegen anderer Ergebnisse^[50], konnten für mit Digitonin solubilisierter *E. gracilis*-Mitochondrien weder Komplex-IV-enthaltende Superkomplexe, noch Komplex-IV-Monomere bzw. -Dimere nachgewiesen werden. Auch entsprechende Aktivitätstests in hrCN-Gelen verliefen negativ (Daten nicht gezeigt). Lediglich bei Solubilisierungen von *E. gracilis*-Mitochondrien mit DDM konnte nach Test auf Komplex-IV-Aktivität eine Bande gefärbt werden, bei der es sich anhand der Wanderungsstrecke im BN-Gel um III_2IV_1 handeln könnte (Daten nicht gezeigt).

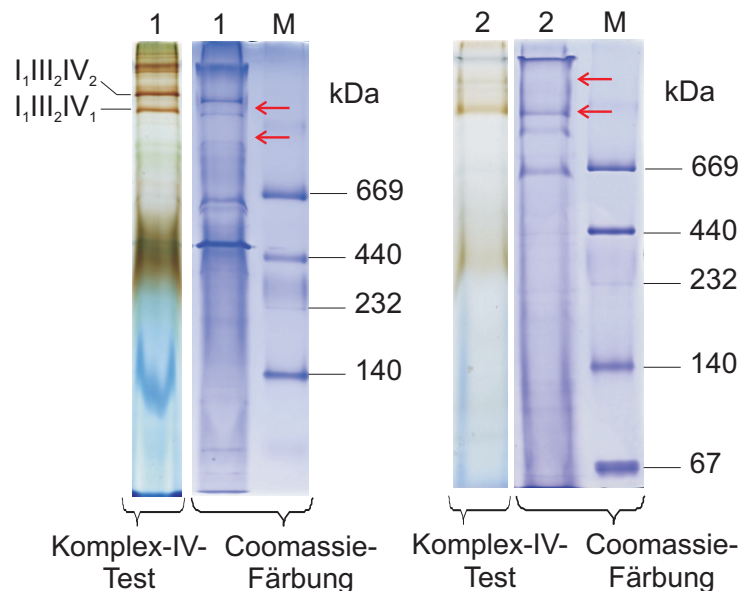


Abbildung 5.78: BN-PAGE mit Solubilisaten verschiedener Organismen. Die Spuren (1) und (2) sind mit solubilisierten Mitochondrien einer photomixotrophen *C. reinhardtii*-Kultur bzw. *A. longa* beladen. Die Solubilisierungen werden für *C. reinhardtii*-Mitochondrien mit 25 g Digitonin g⁻¹ Chlorophyll bei einer Chlorophyll-Endkonzentrationen von 0,4 mg mL⁻¹ durchgeführt, für *A. longa*-Mitochondrien mit 6 g Digitonin g⁻¹ Protein und 0,8 mg mL⁻¹ Protein-Endkonzentration. Es sind jeweils die in Komplex-IV-Testpuffer inkubierten und Coomassie gefärbten Gelstreifen gezeigt. Die mit (M) bezeichnete Spur enthält den Proteinstandard HMW. Die roten Pfeile rechts zeigen zwei Komplex-IV-enthaltende *A. longa*-Superkomplexe an. Zum Vergleich ist mit den roten Pfeilen links die theoretische Lage der *A. longa*-Superkomplexbanden im *C. reinhardtii*-BN-Gel gezeigt.

Links in Abbildung 5.78 sind nach Inkubation des mit solubilisierten Mitochondrien aus *C. reinhardtii* beladenen BN-Gelstreifens in Komplex-IV-Testpuffer deutlich die Superkomplexbanden S1 und S2 zu erkennen. Zusätzlich zeichnen sich auch im Massenbereich darüber weitere Komplex-IV-aktive Banden ab. Für die *A. longa*-Probe rechts in Abbildung 5.78 werden nach dem *In-Gel*-Aktivitätstests für Komplex IV zwei Superkomplexbanden detektiert. Die roten Pfei-

le links illustrieren die theoretische Lage der *A. longa*-Superkomplexbanden im Vergleich zu *C. reinhardtii*. Bereits in Abbildung 5.77 wurde für *A. longa* ein Komplex-I-enthaltender Superkomplex im BN-Gel gefärbt, dessen Masse anhand der Migrationsstrecke im BN-Gel kleiner als S1 aus *C. reinhardtii* ist. Da diese Bande in Abbildung 5.78 zusätzlich Komplex-IV-Aktivität zeigt, könnte es sich hierbei um einen Superkomplex bestehend aus I_1IV_1 handeln. Der größere Superkomplex in Spur (2) (roter Pfeil rechts oben in Abbildung 5.78), der hier Komplex-IV-Aktivität zeigt, konnte im BN-Gel nach Test auf Komplex I nicht detektiert werden (Abbildung 5.77). Die Wanderungsstrecke dieses Superkomplexes im BN-Gel stimmt mit der des Superkomplexes S1 aus *C. reinhardtii* überein und könnte somit ebenfalls die Zusammensetzung $I_1III_2IV_1$ haben. Eine mögliche Begründung für das Nichtauffinden des größeren *A. longa*-Superkomplexes nach Inkubation des BN-Gelstreifens in Komplex-I-Testpuffer könnte sein, dass beide Aktivitätstests Unterschiede bezüglich ihrer Sensitivität aufweisen. Die Färbung nach dem Aktivitätstest auf Komplex IV in Abbildung 5.78 ist relativ schwach, sodass die entsprechende Bande nach Untersuchung auf Komplex-I-Aktivität nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Nach eigenen Erfahrungen habe ich für pflanzliche Proben oft festgestellt, dass die Sensitivitäten beider Aktivitätstests für identische Superkomplexe unterschiedlich sind. Es zeigt sich, dass meist mit Hilfe des Tests auf Komplex IV eine Bande detektiert werden kann, nach Test auf Komplex I aber nicht (vergleiche hierzu Abbildung 5.24 auf Seite 102, Spur (S) jeweils nach Komplex-I- und Komplex-IV-Test).

Zusätzlich zu *In-Gel*-Aktivitätstests werden zur Charakterisierung mitochondrialer Proteine immunologische Untersuchungen durchgeführt. Hierzu werden Antikörper gegen Proteinuntereinheiten von Atmungskettenkomplexen (Komplex I 20 kDa UE, Komplex IV COXIIb 15 kDa UE), der alternativen Oxidase (AOX1 35 kDa UE), Prohibitin (Ab-2 30 kDa UE) sowie dem ubiquitär vorkommenden Hitze-Schock-Protein HSP70 verwendet. In Abbildung 5.79 sind PVDF-Membranen gezeigt, auf denen solubilisierter, mittels BN-PAGE aufgetrennte Mitochondrien aus *C. reinhardtii*, *E. gracilis* und *A. longa* per Western-Blot immobilisiert worden sind. Inkubiert werden die Blotmembranen mit Antikörpern gegen eine 20 kDa UE aus Komplex I bzw. die UE IIb aus Komplex IV. Links in Abbildung 5.79 kann für *A. longa* (Spur (4)) eine schwache Bande detektiert werden (roter Pfeil), die auf einen Komplex-I-enthaltenden Superkomplex zurückzuführen ist. Bei den Banden mit hohen Molekularmassen in den Spuren (1–3) könnte es sich um detektierte Komplex-I-enthaltende Superkomplexe handeln. Es ist allerdings unverständlich, weshalb nur diese Banden gefärbt werden und nicht zusätzlich kleinere Superkomplexe, oder im Falle von Mitochondrien aus *C. reinhardtii* das Komplex-I-Monomer. Die Inkubation der PVDF-Membran in Antikörperlösungen gegen die UE IIb der Cytochrom-c-Oxidase (COX, Komplex IV) zeigt für *C. reinhardtii* eindeutige Ergebnisse. Hier können die beiden Superkomplexe S1 und S2, sowie ein darüber liegender Superkomplex detektiert werden. Zusätzlich wird das Monomer für Komplex IV gefärbt. Nach dem Entfernen der Antikörper, erneutem Inkubieren in den entsprechenden Antikörperlösungen und Detektion über das AP-System, kann auch für die photoautotrophe Anzucht das identische Bandenmuster wie für die photomixotrophe Probe nach HRP-Detektion sichtbar gemacht werden.

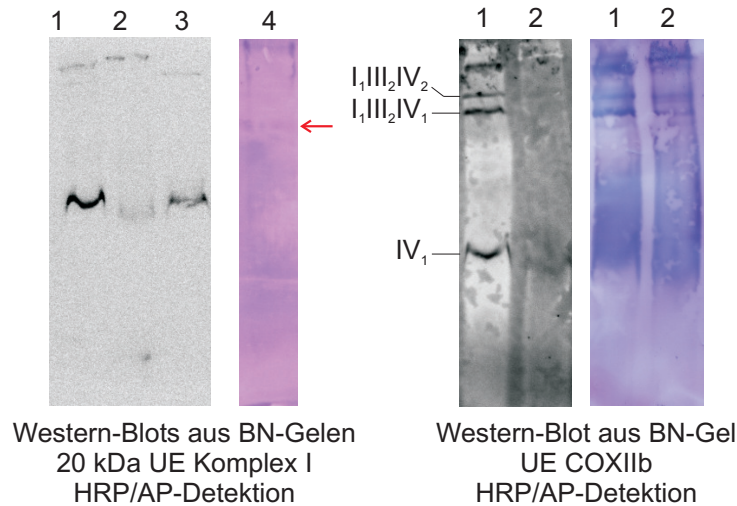


Abbildung 5.79: Mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen immobilisierte Proteinkomplexe aus *C. reinhardtii*-, *E. gracilis*- und *A. longa*-Mitochondrien. Links sind die mit Antikörpern gegen eine 20 kDa UE aus Komplex I inkubierten Blotmembranen der drei Organismen gezeigt, rechts die mit Antikörpern gegen die UE IIb aus Komplex IV. Die Spuren (1) und (2) des geblotteten BN-Gels wurden mit *C. reinhardtii*-Mitochondrien einer photomixotrophen bzw. einer photoautotrophen Anzucht beladen und gelelektrophoretisch getrennt, die Spuren (3) und (4) mit *E. gracilis*- bzw. *A. longa*-Mitochondrien. Die Solubilisierungen werden für *C. reinhardtii*- und *E. gracilis*-Mitochondrien mit 25 g Digitonin g⁻¹ Chlorophyll bei einer Chlorophyll-Endkonzentration von 0,4 mg mL⁻¹ durchgeführt (0,14 mg mL⁻¹ für photoautotrophe *C. reinhardtii*-Anzucht), für *A. longa*-Mitochondrien mit 6 g Digitonin g⁻¹ Protein und 0,6 mg mL⁻¹ Protein-Endkonzentration. Die Detektion erfolgt über das Horseradish-peroxidase-System (HRP) bzw. das alkalische-Phosphatase-System (AP).

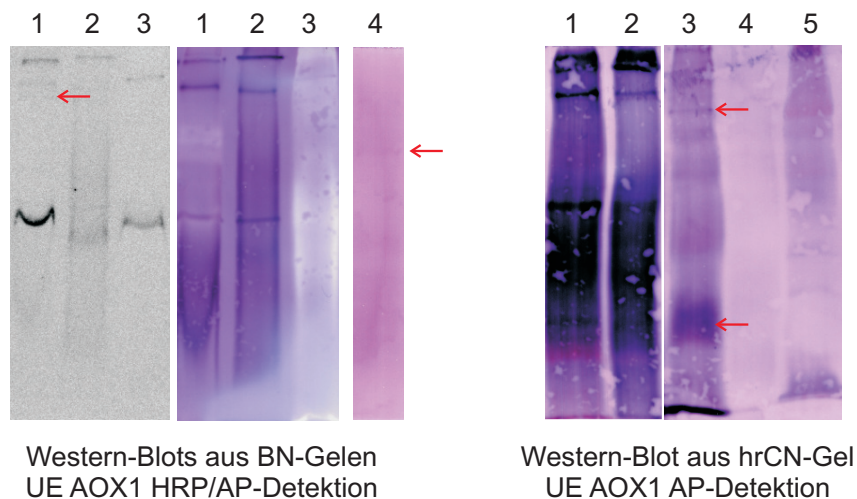


Abbildung 5.80: Mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen immobilisierte Proteinkomplexe aus *C. reinhardtii*-, *E. gracilis*-, *A. longa*-Mitochondrien sowie *N. muscorum*-Thylakoiden. Inkubiert werden die Blotmembranen mit einer Antikörperlösung gegen die AOX1-UE der alternativen Oxidase (AOX). Die Solubilisierungen und Gelbeladungen (BN- und hrCN-Gel) entsprechen denen aus Abbildung 5.79 (Spuren (1–4)). Spur (5) enthält solubilisierete Thylakoide aus *N. muscorum* (identisches Digitonin-zu-Chlorophyll-Verhältnis, 0,2 mg mL⁻¹ Chlorophyll-Endkonzentration). Links sind die aus BN-Gelen geblotteten PVDF-Membranen gezeigt, rechts die aus hrCN-Gelen. Die Detektion erfolgt über das Horseradish-peroxidase-System (HRP) bzw. das alkalische-Phosphatase-System (AP).

Zur Detektion der in pflanzlichen Proben häufig vorkommenden alternativen Oxidase (AOX) werden aus BN- und hrCN-Gelen geblottete Proteinkomplexe mit einer Antikörperlösung gegen die UE AOX1 inkubiert und mit Hilfe des HRP- bzw. AP-Systems detektiert. In Abbildung 5.80 ist das Ergebnis gezeigt. Zwischen der HRP-Detektion und der AP-Detektion der Spuren (1–3) links in Abbildung 5.80 zeichnen sich nur geringfügige Unterschiede ab. In Spur (1) nach HRP-Detektion wird eine Bande schwach gefärbt, die mittels des AP-Systems nicht aufgefunden werden kann (roter Pfeil links in Abbildung 5.80). Allerdings muss gesagt werden, dass der hier verwendete Antikörper für *C. reinhardtii* keine spezifische Reaktivität zeigt. Bei den gefärbten Banden im höheren Molekularmassenbereich handelt sich eher um oligomere Formen mitochondrialer ATP-Synthasen. Für die aus einem hrCN-Gel geblottete *C. reinhardtii*-Probe trifft dies ebenfalls zu. In Spur (4) wird eine sehr schwach gefärbte Bande aus dem geblotteten BN-Gel detektiert (roter Pfeil in der Mitte von Abbildung 5.80). Auch hier ist es fraglich, ob es sich bei dieser Bande um einen AOX-enthaltenden Superkomplex aus *A. longa* handelt. Lediglich bei den detektierten Banden in den Spuren der *E. gracilis*-Probe könnte es sich im höheren Molekularmassenbereich um AOX-enthaltende Superkomplexe bzw. um AOX selbst im niedermolekularen Bereich handeln (siehe rote Pfeile in Spur (3) im hrCN-Gel). Die hier detektierten Banden befinden sich auf gleicher Höhe der mittels Komplex-I-Aktivitätstest gefärbten *E. gracilis*-Superkomplexe (vergleiche Spur (3) links in Abbildung 5.77). Durch ein überwiegendes Vorhandensein AOX-enthaltender Superkomplexe in *E. gracilis*-Mitochondrien könnte die Tatsache erklärt werden, weshalb *In-Gel*-Aktivitätstest bezüglich Komplex IV für *E. gracilis* stets negativ verlaufen. Für *N. muscorum* (Spur (5)) werden im ähnlichen Massenbereich wie für *E. gracilis* Banden detektiert, die allerdings weniger intensiv gefärbt sind. In Abbildung 5.81 ist das Ergebnis des immunologischen Tests mit Antikörpern gegen Untereinheiten des Hitzeschockproteins HSP70 bzw. aus Prohibitin (PHB) gezeigt.

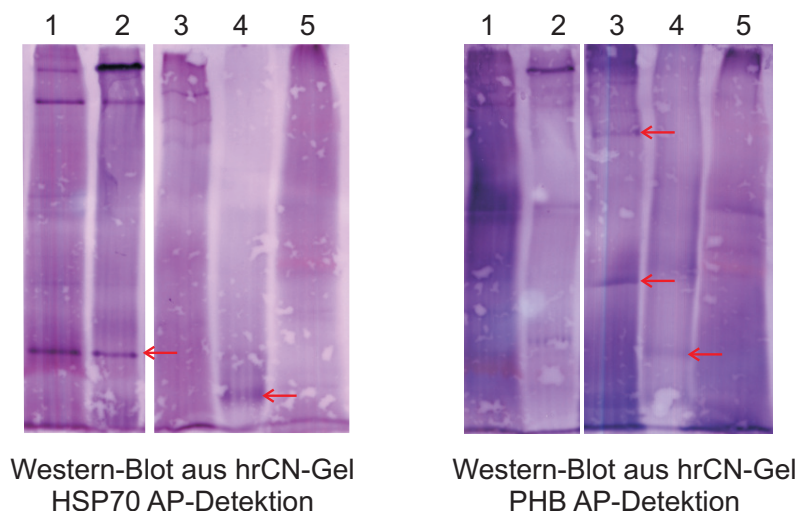


Abbildung 5.81: Mittels Western-Blot auf PVDF-Membranen immobilisierte Proteinkomplexe aus *C. reinhardtii*-, *E. gracilis*-, *A. longa*-Mitochondrien sowie *N. muscorum*-Thylakoiden. Links ist die mit einer Antikörperlösung gegen eine UE aus HSP70 inkubierte Blotmembran gezeigt, rechts die mit einer Antikörperlösung gegen eine UE aus Prohibitin (PHB) inkubierte. Die Solubilisierungen und Gelbeladungen entsprechen denen aus Abbildung 5.79 (Spuren (1–4)) bzw. Abbildung 5.80 (Spur (5)). Die Detektion erfolgt über das alkalische-Phosphatase-System (AP).

Auffällig ist, dass das Bandenmuster für Mitochondrien aus *C. reinhardtii* (Spuren (1–2) in Abbildung 5.81) im hohen Massenbereich für beide detektierten Antikörper sehr ähnlich aussieht. Hierbei handelt es sich allerdings eher um die oligomeren Formen mitochondrialer ATP-Synthasen, sodass hier für die Proteinkomplexe HSP70 und PHB keine spezifische Antikörperreaktion erhalten werden konnte. Im Massenbereich um 140 kDa werden für beide Kultivierungsvarianten nach Detektion des Antikörpers gegen eine HSP70-UE je eine Bande gefärbt (roter Pfeil an Spur (2) links in Abbildung 5.81). Aufgrund der Masse könnte es sich hierbei um HSP70 in dimerer Form handeln. Für *A. longa* kann ebenfalls im niedrigen Massenbereich eine Bande detektiert werden, die auf HSP70 als Monomer zurückgeführt werden könnte (roter Pfeil an Spur (4) links in Abbildung 5.81). Im Unterschied zu *C. reinhardtii* können für *E. gracilis* nach Inkubation der Blotmembran in Antikörperlösung gegen eine UE aus Prohibitin entsprechende Banden detektiert werden (rote Pfeile an Spur (3) rechts in Abbildung 5.81). Mit einer Masse von etwa 1000 kDa des Prohibitin-Komplexes in Pflanzen^[112] stimmt die obere Bande in Spur (3) mit dem Pflanzen-PHB-Komplex überein. Bei der unteren Bande kann es sich um einen teilweise zerfallenen Prohibitin-Komplex handeln. Auch für *A. longa* kann im niedrigen Massenbereich ein Zerfallsprodukt des Prohibitin-Komplexes detektiert werden. In der solubilisierten Thylakoide aus *N. muscorum* enthaltenden Spur (5) rechts in Abbildung 5.81 werden nach der Detektion von Antikörpern gegen eine PHB-UE zwar Banden sichtbar, diese sind allerdings weniger intensiv gefärbt als bei *E. gracilis*, und es ist nicht sicher, inwiefern es sich bei diesen Banden um spezifische Antikörperreaktionen handelt.

5.6.2.1 ESI-MS/MS Untersuchungen von Superkomplexen aus *E. gracilis*-Mitochondrien

Zur Erweiterung der erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung von mitochondrialen Superkomplexen aus *E. gracilis* werden massenspektrometrische Analysen der Superkomplexe $S_{\text{groß}}$ und S_{klein} (vergleiche Komplex-I-Aktivitätstest links in Abbildung 5.45 auf Seite 124) durchgeführt. Hierzu werden die entsprechenden Banden aus der ersten Dimension eines BN-Gels ausgeschnitten, eluiert und tryptisch verdaut (ausführliche Beschreibung der Probenvorbehandlung siehe Dissertation Eva R. Schäfer (2011)^[113]). Die massenspektrometrische Untersuchung der lyophilisierten Proben wird von Dr. Sascha Rexroth am Institut für Biochemie der Pflanzen an der Ruhr-Universität Bochum in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Matthias Rögner durchgeführt. In Tabelle 5.6 sind die massenspektrometrisch identifizierten Peptide des *E. gracilis*-Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ gezeigt. Es werden nur Proteine aufgeführt, für die ≥ 5 Peptide gefunden werden. Die Daten der identifizierten Peptide des kleineren Superkomplexes werden nicht gezeigt, da hier für Atmungskettenkomplexe weniger als 5 Peptide gefunden wurden. Es zeigt sich, dass mit Hilfe der ESI-MS/MS für den Superkomplex $S_{\text{groß}}$ aus *E. gracilis*-Mitochondrien neben sehr vielen Proteinen des Photosyntheseapparates auch einige UE der Cytochrom-*c*-Reduktase identifiziert werden können (identifizierte UE von Komplex III sind in Tabelle 5.6 in rot dargestellt). Bereits in Abschnitt 5.3.2.2 auf Seite 105 konnte festgestellt werden, dass es sich bei der gelelektrophoretisch aufgetrennten Superkomplexbande $S_{\text{groß}}$ tatsächlich um zwei Protein(super)komplexe handelt, die zufällig eine sehr ähnliche Masse

aufweisen (siehe Abbildung 5.29). Die große Anzahl mittels ESI-MS/MS gefundener Photosyntheseenzyme zusammen mit Untereinheiten aus Komplex III bestätigen diese Vermutung. Die hier erhaltenen Ergebnisse zusammen mit den EM-Aufnahmen der Einzelpartikeluntersuchungen (Abbildung 5.64), die *In-Gel*-Aktivität für Komplex I sowie der immunologische Hinweis auf das Vorhandensein von AOX in *E. gracilis*-Superkomplexen lassen den Schluss zu, dass der Superkomplex $S_{\text{groß}}$ aus den Proteinkomplexen $I_1III_2AOX_x$ bestehen könnte.

Tabelle 5.6: Mittels ESI-MS/MS identifizierte Proteine des Superkomplexes $S_{\text{groß}}$ aus *E. gracilis*-Mitochondrien. Es sind nur Proteine aufgeführt, für die ≥ 5 Peptide gefunden werden. Proteine der mitochondrialen Atmungskette sind in rot dargestellt.

NCBI nr	Proteinbeschreibung	Peptide
DAA05888.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor Lhca1	22
DAA05887.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor Lhca2	20
BAA04079.2	complex III subunit I precursor	12
P43264.1	Ubiquinol-cytochrome-c-reductase complex core protein I, mitochondrial precursor	12
ABW06947.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	15
BAA04080.1	complex III subunit II precursor	11
P43265.1	Ubiquinol-cytochrome-c-reductase complex core protein 2, mitochondrial precursor	11
P08976.1	Light-harvesting complex I LH38 proteins precursor Contains: LH38 protein 1; LH38 protein 2; LH38 protein 3	11
CAA31338.1	unnamed protein product	11
ABW06946.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	10
DAA05881.1	chloroplast light-harvesting complex II protein precursor Lhcbm1	12
CAA43633.1	light harvesting chlorophyll <i>a/b</i> binding protein of PSII	11
ABW06950.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	6
ABW06948.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	9
ABW06951.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	5
P14963.1	Elongation factor 1- α	5
CAA34769.1	unnamed protein product	5
ABW06954.1	chloroplast light-harvesting complex II protein precursor	5
DAA05883.1	chloroplast light-harvesting complex II protein precursor Lhcbm4	6
AAK37837.1	beta-tubulin	5
AAK37836.1	beta-tubulin	5
AAK37834.1	beta-tubulin	5
AAK37838.1	beta-tubulin	5
ABW06953.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	5
ABW06952.1	chloroplast light-harvesting complex I protein precursor	10
DAA05885.1	chloroplast light-harvesting complex II protein precursor Lhcbm5	7

5.6.2.2 *In-Lösung*-Aktivitätstests

Neben den rein qualitativen *In-Gel*-Aktivitätstests können mit Hilfe spektralphotometrischer Messungen Enzymaktivitäten in Lösung quantifiziert werden. Entsprechend der in Abschnitt

4.9 auf Seite 63 beschriebenen Durchführung wird an Mitochondrien aus Rinderherz Komplex-I-Aktivität spektralphotometrisch gemessen. In Abbildung 5.82 sind die Ergebnisse aus insgesamt sechs Messungen dargestellt. Für die jeweiligen Lösungszugaben ist es erforderlich, während der Messung kurzzeitig den Deckel des Spektralphotometers zum Probenraum zu öffnen, wodurch es zuerst zu einem starken Abfall, dann zu einem starken Anstieg des Signals kommt.

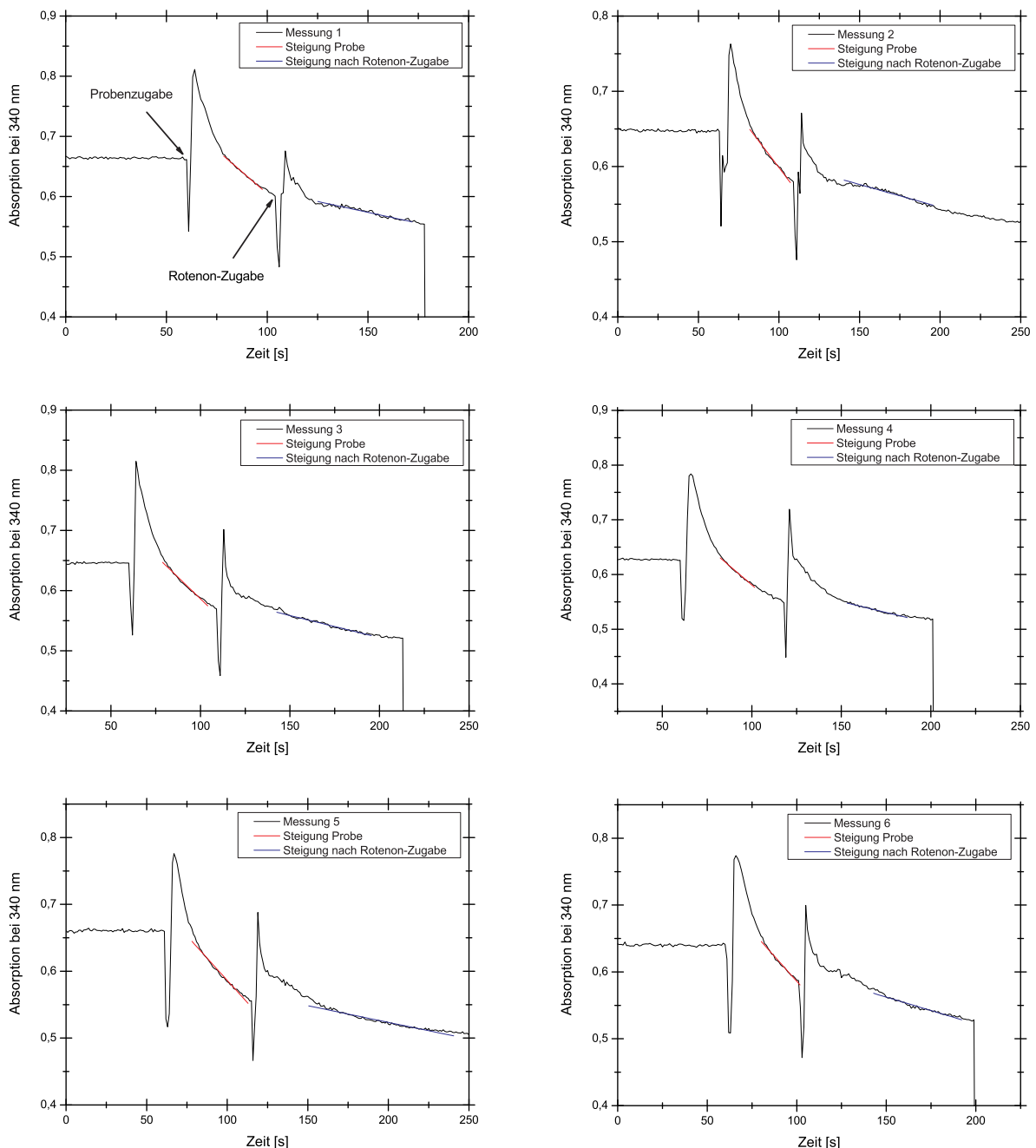


Abbildung 5.82: In-Lösung-Komplex-I-Aktivitätstest mit BHM. Die Messung der Absorption von NADH in der vorgelegten Substratlösung erfolgt bei 340 nm. Nach ca. 1 min werden etwa 50 μg BHM zur Substratlösung zugegeben und der resultierende Signalabfall gemessen. Zur Inhibierung von Komplex I werden 20 μL Rotenon hinzupipettiert ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$). Anhand der jeweiligen Steigungen (Steigung der Probe in rot, Steigung nach Rotenon-Zugabe in blau) kann die Aktivität für Komplex I berechnet werden.

Zur Berechnung der Aktivitäten werden die relativ konstanten Steigungen des Messsignals nach den jeweiligen Lösungszugaben verwendet. Die Steigung der Probe ist in Abbildung 5.82 jeweils in rot dargestellt, die nach Inhibitor-Zugabe (Rotenon) in blau. Der aus diesem Datensatz erhaltene Mittelwert ($n = 6$) der spezifischen Komplex-I-Aktivität für BHM beträgt $0,475 \pm 0,015 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. Im Vergleich zu spektralphotometrischen Aktivitätsmessungen von isolierten BHM Superkomplexen^[34] kann hier eine höhere spezifische Aktivität festgestellt werden. Diese Tatsache ist allerdings nicht verwunderlich, da im durchgeführten Experiment die Gesamt-Komplex-I-Aktivität gemessen worden ist. Bei der Durchführung dieses Experimentes mit Mitochondrien aus *E. gracilis* konnte keine Signalabnahme nach Probenzugabe zum Substrat festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Ein möglicher Grund hierfür könnte das in der Probe vorhandene Chlorophyll sein, das die Messung stört und den Komplex-I-bedingten Signalabfall überdeckt. Um dieses Problem zu umgehen wird die spezifische Komplex-I-Aktivität in farblosen *A. longa*-Mitochondrien gemessen. Auch hier wird kein Signalabfall festgestellt (Daten nicht gezeigt). Im Vergleich zur Aktivität in BHM scheint die entsprechende Aktivität in *A. longa*-Mitochondrien so gering zu sein, dass diese hier nicht gemessen werden kann.

5.6.2.3 Fluoreszenzmarkierung von Proteinkomplexen

Eine mögliche Lösung des bereits mehrfach diskutierten Problems des Auffindens von Proteinkomplexen aus CN-Gelen für beispielsweise Elutionen selbiger aus den Gelen, stellt die Markierung von Proteinkomplexen mit Fluoreszenzfarbstoffen dar. Die Durchführung der Proteinmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-505 X5 erfolgt wie in Abschnitt 4.12 auf Seite 71 beschrieben. Abbildung 5.83 zeigt zwei CN-Gele, die mit farbstoffmarkierten, solubilisierten BHM beladen worden sind. Zum einen wurden BHM vor der Solubilisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff markiert (CN-Gel oben in Abbildung 5.83), zum anderen nach der Solubilisierung (CN-Gel unten). Die Detektion des Fluoreszenzfarbstoffs erfolgt mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS-3000 von FujiFilm (Excitationsfilter 470 nm, Emissionsfilter 515 nm). Im Anschluss daran werden die CN-Gele Coomassie gefärbt (jeweils rechts in Abbildung 5.83). Die Solubilisierungen werden jeweils mit Digitonin durchgeführt. Für die Farbstoffmarkierung nach der Solubilisierung werden 40 µg solubilierte BHM ($3 \text{ g Digitonin g}^{-1} \text{ Protein}$) mit unterschiedlichen Mengen an Farbstoff in 160 µL BMK-Puffer (siehe Tabelle 4.52, Seite 72) inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion mit L-Lysin werden je 20 µL (ca. 5 µg BHM) dieser Mischung gelelektrophoretisch getrennt. Für die Farbstoffmarkierung vor der Solubilisierung werden 400 µg BHM sedimentiert und in 160 µL BMK-Puffer resuspendiert. Es werden die gleichen Mengen an Farbstoff eingesetzt wie bei der Markierungsvariante nach der Solubilisierung. Durch Zugabe von 10 µL Digitonin (10 % (w/v)) erfolgt die Solubilisierung der markierten BHM. Das Digitonin-zu-Protein-Verhältnis ist hier mit ca. $2,6 \text{ g g}^{-1}$ ähnlich dem Verhältnis der nach Solubilisierung markierten Probe. Auch hier wird das CN-Gel mit 20 µL markierter Probe beladen, was mit etwa 50 µg der 10fachen Menge an BHM im Vergleich zur nach Solubilisierung markierten Probe entspricht. Bei Betrachtung der Coomassie gefärbten Gele in Abbildung 5.83 ist dieser Unterschied deutlich zu sehen. Für beide Markierungsvarianten werden die gleichen

Mengen an Farbstoff eingesetzt, sodass das Fluoreszenzfarbstoff-zu-Protein-Verhältnis für die Markierungsvariante nach Solubilisierung um den Faktor 10 höher ist als für die Markierungsvariante vor Solubilisierung. Auch dieser Effekt ist in Abbildung 5.83 deutlich zu erkennen. Für beide Markierungsvarianten werden fluoreszierende Banden detektiert. Im Massenbereich über 669 kDa wird das Monomer von Komplex I sowie entsprechende Komplex-I-enthaltende Superkomplexe gefärbt. Für die Markierungsvariante vor Solubilisierung kann in den Spuren (4) und (5) auch das ATP-Synthase-Monomer detektiert werden sowie IV_2 .

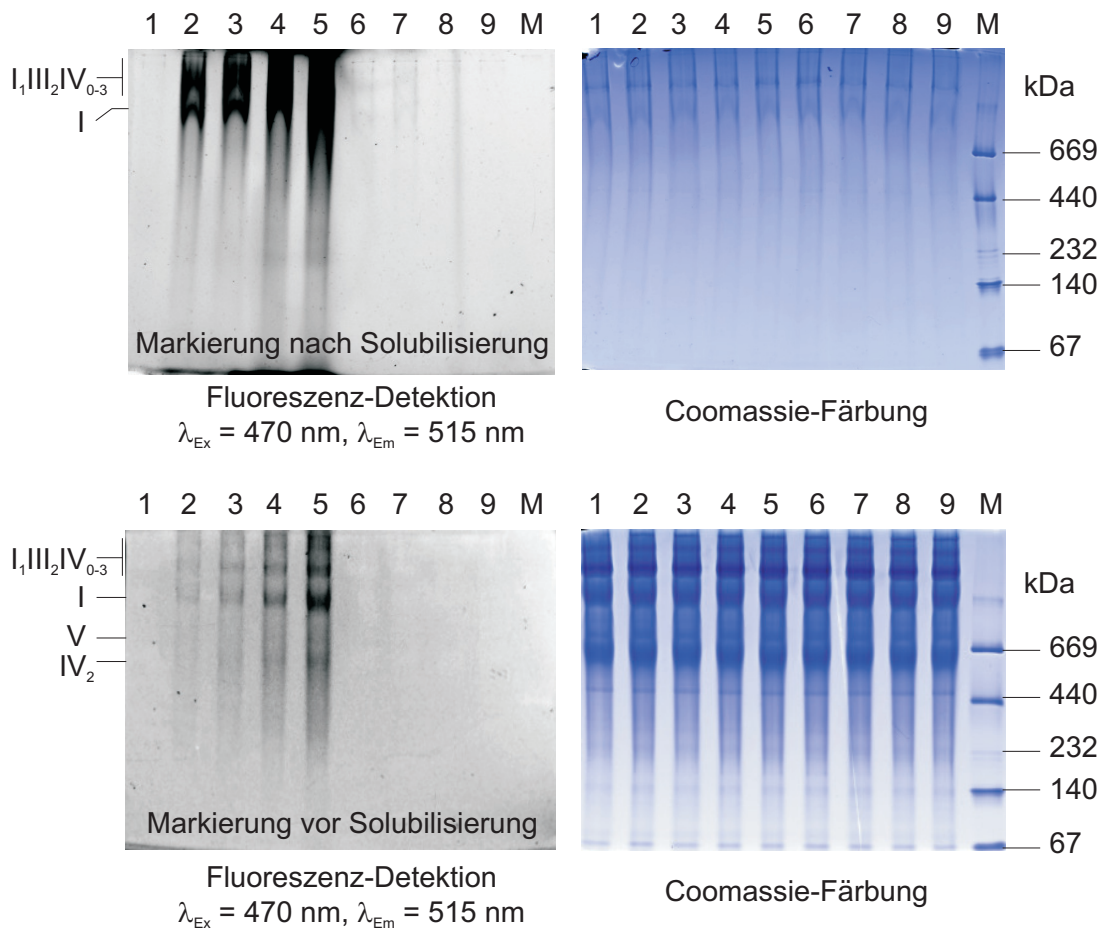


Abbildung 5.83: Fluoreszenzfarbstoffmarkierung von BHM. Die Markierung wird zum einen nach der Solubilisierung (oben), zum anderen vor der Solubilisierung (unten) durchgeführt. Das CN-Gel oben wird mit etwa 5 μ g BHM pro Spur beladen, das CN-Gel unten je Spur etwa 50 μ g BHM. Die Spuren (2–7) enthalten Proben, die mit 400, 800, 1600, 3200, 32 und 64 pmol Farbstoff markiert wurden. Zur Kontrolle enthält Spur (1) unmarkierte BHM in BMK-Puffer bzw. enthalten die Spuren (8) und (9) BHM-Proben mit Volumina an Lösemittel ohne Farbstoff (3,2 bzw. 6,4 μ L DMF, entspricht den Volumina an Lösemittel mit Farbstoff der Spuren (6) und (7)). Spur (M) enthält den Proteinstandard HMW.

Prinzipiell kann gezeigt werden, dass die Markierung von Proteinkomplexen aus BHM sowohl vor als auch nach der Solubilisierung gut funktioniert. Ein direkter Vergleich beider Varianten ist hier nicht möglich, da im Falle der Markierung vor der Solubilisierung die 10fache Menge an Protein eingesetzt und auf das CN-Gel aufgetragen worden ist. Zur besseren Diskriminierung einzelner Banden ist das für diese Variante gewählte Fluoreszenzfarbstoff-zu-Protein-Verhältnis besser geeignet. Ein kleineres Verhältnis wie im Falle der Markierung nach der Solubilisierung

führt zu einem starken Verschmieren von Farbstoff, was die Bandendetektion erschwert. Um zu überprüfen, ob die Farbstoffmarkierung negative Einflüsse auf die Aktivität der jeweiligen Proteinkomplexe bzw. Superkomplexe hat, werden farbstoffmarkierte BHM-Proben nach der Gelelektrophorese auf Komplex-I- bzw. Komplex-IV-Aktivität im Gel hin untersucht. Abbildung 5.84 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. 400 µg BHM werden sedimentiert, in 80 µL BMK-Puffer resuspendiert und mit unterschiedlichen Mengen an Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Solubilisierung wird durch Zugabe von 30 µL Digitonin (10 % (w/v)) eingeleitet, wodurch ein Detergens-zu-Protein-Verhältnis von etwa 8 g g⁻¹ erhalten wird. Die auf das CN-Gel aufgetragene Proteinmasse wird auf etwa 25 µg reduziert (7 µL pro Spur).

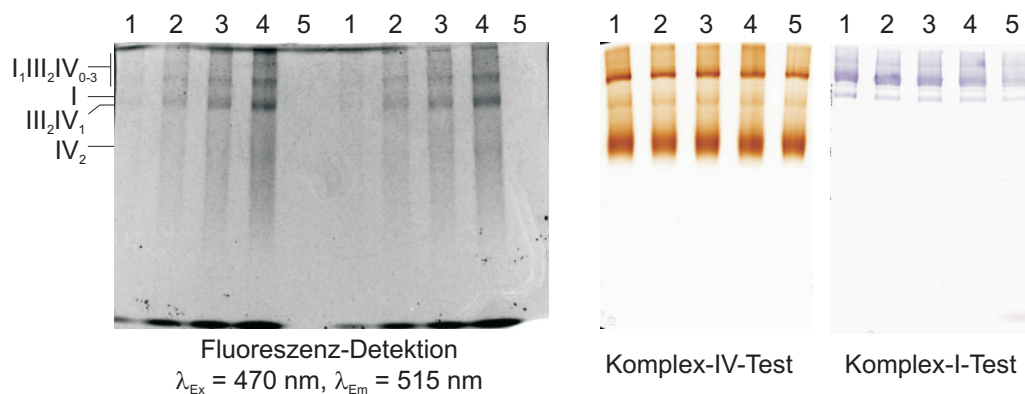


Abbildung 5.84: Fluoreszenzfarbstoffmarkierung von BHM. Die Markierung wird vor der Solubilisierung durchgeführt und je Spur etwa 25 µg BHM auf das CN-Gel aufgetragen. Die Spuren (1–4) enthalten Proben die mit 400, 800, 1600 und 3200 pmol Farbstoff markiert wurden (links). Zur Kontrolle enthält Spur (5) unmarkierte BHM in BMK-Puffer. Im Anschluss an die Elektrophorese wird je ein Gelteil (jeweils Spuren (1–5)) in Komplex-IV- bzw. Komplex-I-Aktivitätstestlösung inkubiert (rechts).

Wie die Ergebnisse der *In-Gel*-Aktivitätstests rechts in Abbildung 5.84 zeigen, kann weder für Komplex I noch für Komplex IV eine Aktivitätsbeeinträchtigung durch die Farbstoffmarkierung festgestellt werden. Aufgrund des relativ hohen Anteils an L-Lysin in hydrophoben Domänen von Membranproteinen eignet sich der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff gut, da dieser an die α -Aminogruppe des N-Terminus und an die ϵ -Aminogruppe von Lysinseitenketten bindet^[99]. Die erhaltenen Ergebnisse der Proteinmarkierungen mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-505 X5 bestätigen diese Tatsache, da ausschließlich hydrophobe Proteinkomplexe der mitochondrialen Atmungskette nach Fluoreszenz-Anregung detektiert werden (siehe Abbildungen 5.83 und 5.84). Neben der Fluoreszenz-Detektion mit Hilfe des Luminescent Image Analyzer LAS-3000 von FujiFilm, werden die fluoreszenzmarkierten Proteinkomplexe auch durch Blaulichtanregung (470 nm) auf einem Lichttisch sichtbar gemacht (Daten nicht gezeigt). Auf diese Weise ist es sehr einfach entsprechend markierte Proteinkomplexe aus einem PA-Gel auszuscheiden und für weitere Analysen beispielsweise zu eluieren. Analog zu BHM werden auch Mitochondrien aus *E. gracilis* mit dem Fluoreszenzfarbstoff DY-505 X5 markiert und gelelektrophoretisch getrennt. Der präparationsbedingte hohe Anteil an Chlorophyll in *E. gracilis*-Mitochondrien führt allerdings dazu, dass nicht zwischen Chromophor-enthaltenden Proteinkomplexen und fluoreszenzmarkierten Proteinkomplexen diskriminiert werden kann (Daten

nicht gezeigt). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Fluoreszenzmarkierung von Thylakoiden aus Spinat-Chloroplasten^[69] erhalten. Auch hier überdeckte die auf Chlorophyll zurückzuführende Fluoreszenz die der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Proteinkomplexe.



Literaturverzeichnis

- [1] Sorguven, E. und Özilgen, M., Thermodynamic assessment of algal biodiesel utilization, *Renew. Energ.* **35**, 1956 – 1966 (2010).
- [2] Raupach, M.R., Marland, G., Ciais, P., Le Quéré, C., Canadell, J.G., Klepper, G. und Field, C.B., Global and regional drivers of accelerating CO₂ emissions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 10288–10293 (2007).
- [3] Canadell, J.G., Le Quéré, C., Raupach, M.R., Field, C.B., Buitenhuis, E.T., Ciais, P., Conway, T.J., Gillett, N.P., Houghton, R.A. und Marland, G., Contributions to accelerating atmospheric CO₂ growth from economic activity, carbon intensity, and efficiency of natural sinks, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 18866–18870 (2007).
- [4] Sivakumar, G., Vail, D.R., Xu, J., Burner, D.M., Lay, J.O., Ge, X. und Weathers, P.J., Bioethanol and biodiesel: Alternative liquid fuels for future generations, *Eng. Life Sci.* **10**, 8–18 (2010).
- [5] Haag, A.L., Algae bloom again, *Nature* **447**, 520–521 (2007).
- [6] Koh, L.P. und Wilcove, D.S., Is oil palm agriculture really destroying tropical biodiversity?, *Conserv. Lett.* **1**, 60–64 (2008).
- [7] Teymouri, F., Laureano-Perez, L., Alizadeh, H. und Dale, B.E., Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover, *Bioresour. Technol.* **96**, 2014 – 2018 (2005).
- [8] Wyman, C.E., Dale, B.E., Elander, R.T., Holtzapple, M., Ladisch, M.R. und Lee, Y., Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies, *Bioresour. Technol.* **96**, 1959 – 1966 (2005).
- [9] Harnpicharnchai, P., Champreda, V., Sornlake, W. und Eurwilaichitr, L., A thermotolerant β -glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars, *Protein Expression Purif.* **67**, 61 – 69 (2009).
- [10] Gomez, L.D., Steele-King, C.G. und McQueen-Mason, S.J., Sustainable liquid biofuels from biomass: the writing's on the walls, *New Phytol.* **178**, 473–485 (2008).
- [11] Nagle, N. und Lemke, P., Production of methyl ester fuel from microalgae, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **24-25**, 355–361 (1990).
- [12] Rosello Sastre, R. und Posten, C., Die vielfältige Anwendung von Mikroalgen als nachwachsende Rohstoffe, *Chem. Ing. Tech.* **82**, 1925–1939 (2010).
- [13] Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S. und Rengasamy, R., A perspective on the biotechnological potential of microalgae, *Crit. Rev. Microbiol.* **34**, 77–88 (2008).
- [14] Chisti, Y., Biodiesel from microalgae, *Biotechnol. Adv.* **25**, 294 – 306 (2007).

-
- [15] Velasquez-Orta, S.B., Curtis, T.P. und Logan, B.E., Energy from algae using microbial fuel cells, *Biotechnol. Bioeng.* **103**, 1068–1076 (2009).
- [16] He, Z. und Angenent, L.T., Application of Bacterial Biocathodes in Microbial Fuel Cells, *Electroanal.* **18**, 2009–2015 (2006).
- [17] Melis, A., Seibert, M. und Ghirardi, M.L., Hydrogen fuel production by transgenic microalgae, *Adv. Exp. Med. Biol.* **616**, 110–121 (2007).
- [18] Beer, L.L., Boyd, E.S., Peters, J.W. und Posewitz, M.C., Engineering algae for biohydrogen and biofuel production, *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**, 264–271 (2009).
- [19] Suhai, T., Funktionelle und strukturelle Charakterisierung von F₀F₁-ATP-Synthasen aus Cyanobakterien und Grünalgen, Dissertation, TU Darmstadt (2008).
- [20] Gibbs, S.P., The chloroplast of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **361**, 193–208 (1981).
- [21] Navarro, L., Torres-Márquez, M.E., González-Moreno, S., Devars, S., Hernández, R. und Moreno-Sánchez, R., Comparison of Physiological Changes in *Euglena gracilis* During Exposure to Heavy Metals of Heterotrophic and Autotrophic Cells, *Comp. Biochem. Phys. C* **116**, 265 – 272 (1997).
- [22] Felski, M., Fermentative Gewinnung von Paramylon durch *Euglena gracilis* in konditioniertem Kartoffelfruchtwasser, Dissertation, Universität Bielefeld (2004).
- [23] Devars, S., Hernandez, R., Covian, R., Garcia-Horsman, A., Barquera, B. und Moreno-Sanchez, R., The Content of Alternative Oxidase of *Euglena* Mitochondria is Increased by Growth in the Presence of Cyanide and is not Cytochrome o, *J. Eukaryot. Microbiol.* **45**, 122–130 (1998).
- [24] Castro-Guerrero, N.A., Rodríguez-Zavala, J.S., Marín-Hernández, A., Rodríguez-Enríquez, S. und Moreno-Sánchez, R., Enhanced alternative oxidase and antioxidant enzymes under Cd²⁺ stress in *Euglena*, *J. Bioenerg. Biomembr.* **40**, 227–235 (2008).
- [25] Albury, M.S., Affourtit, C., Crichton, P.G. und Moore, A.L., Structure of the plant alternative oxidase. Site-directed mutagenesis provides new information on the active site and membrane topology, *J. Biol. Chem.* **277**, 1190–1194 (2002).
- [26] Moore, A.L. und Albury, M.S., Further insights into the structure of the alternative oxidase: from plants to parasites, *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1022–1026 (2008).
- [27] Albury, M.S., Elliott, C. und Moore, A.L., Towards a structural elucidation of the alternative oxidase in plants, *Physiol. Plant.* **137**, 316–327 (2009).
- [28] Gockel, G. und Hachtel, W., Complete gene map of the plastid genome of the nonphotosynthetic euglenoid flagellate *Astasia longa*, *Protist* **151**, 347–351 (2000).
- [29] Hachtel, W., Gockel, G. und Knauf, U., Genom mit unbekanntem Auftrag: Leukoplasten, *Biol. unserer Zeit* **32**, 304–310 (2002).
- [30] Schägger, H., Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria, *Biochim. Biophys. Acta* **1555**, 154–159 (2002).

-
- [31] Reifschneider, N.H., Goto, S., Nakamoto, H., Takahashi, R., Sugawa, M., Dencher, N.A. und Krause, F., Defining the mitochondrial proteomes from five rat organs in a physiologically significant context using 2D blue-native/SDS-PAGE, *J. Proteome Res.* **5**, 1117–1132 (2006).
- [32] Frenzel, M., Rommelspacher, H., Sugawa, M.D. und Dencher, N.A., Ageing alters the supramolecular architecture of OxPhos complexes in rat brain cortex, *Exp. Gerontol.* **45**, 563–572 (2010).
- [33] Krause, F., Reifschneider, N.H., Vocke, D., Seelert, H., Rexroth, S. und Dencher, N.A., „Respirasome“-like supercomplexes in green leaf mitochondria of spinach, *J. Biol. Chem.* **279**, 48369–48375 (2004).
- [34] Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N.H., Krause, F., Dencher, N.A. und Vonck, J., Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.* **281**, 15370–15375 (2006).
- [35] Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. und Schagger, H., Yeast mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits, *EMBO J.* **17**, 7170–7178 (1998).
- [36] Rexroth, S., zu Tittingdorf, J.M.W.M., Schwassmann, H.J., Krause, F., Seelert, H. und Dencher, N.A., Dimeric H^+ -ATP synthase in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Biochim. Biophys. Acta* **1658**, 202–211 (2004).
- [37] Minauro-Sanmiguel, F., Wilkens, S. und García, J.J., Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: Novel F_0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12356–12358 (2005).
- [38] Harris, E.H., *The Chlamydomonas sourcebook - Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use*, Bd. 1, Academic Press, 2. Aufl. (2009).
- [39] zu Tittingdorf, J.M.W.M., Rexroth, S., Schäfer, E., Schlichting, R., Giersch, C., Dencher, N.A. und Seelert, H., The stoichiometry of the chloroplast ATP synthase oligomer III in *Chlamydomonas reinhardtii* is not affected by the metabolic state, *Biochim. Biophys. Acta* **1659**, 92–99 (2004).
- [40] Pringsheim, E.G. und Wiessner, W., Ernährung und Stoffwechsel von *Chlamydomonas* (Volvocales), *Arch. Microbiol.* **40**, 231–246 (1961).
- [41] Siemeister, G. und Hachtel, W., A circular 73 kb DNA from the colourless flagellate *Astasia longa* that resembles the chloroplast DNA of *Euglena* restriction and gene map, *Curr. Genet.* **15**, 435–441 (1989).
- [42] Shashidhara, L.S. und Smith, A.G., Expression and subcellular location of the tetrapyrrole synthesis enzyme porphobilinogen deaminase in light-grown *Euglena gracilis* and three nonchlorophyllous cell lines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 63–67 (1991).
- [43] Porra, R., Thompson, W. und Kriedemann, P., Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **975**, 384–394 (1989).
- [44] Fayyaz Chaudhary, M. und Merrett, M.J., Glycolate-pathway enzymes in mitochondria from phototrophic, organotrophic and mixotrophic cells of *Euglena*, *Planta* **162**, 518–523 (1984).

-
- [45] Nyhus, K.J., Ikeuchi, M., Inoue, Y., Whitmarsh, J. und Pakrasi, H.B., Purification and characterization of the photosystem I complex from the filamentous cyanobacterium *Anabaena variabilis* ATCC 29413, *J. Biol. Chem.* **267**, 12489–12495 (1992).
- [46] Shibata, M., Kashino, Y., Satoh, K. und Koike, H., Isolation and characterization of oxygen-evolving thylakoid membranes and photosystem II particles from a glaucocystophyte, *Cyanophora paradoxa*, *Plant Cell Physiol.* **42**, 733–741 (2001).
- [47] Bhairi, S. und Mohan, C., Detergents - A guide to the properties and uses of detergents in biology and biochemistry, EMD Biosciences, SanDiego, CA. (2007).
- [48] Casey, J.R. und Reithmeier, R.A., Detergent interaction with band 3, a model polytopic membrane protein, *Biochemistry* **32**, 1172–1179 (1993).
- [49] Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J. und Braun, H.P., Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 3225–3229 (2005).
- [50] Ulrich, A., Isolierung und Charakterisierung von mitochondrialen Membranproteinen aus *Chlamydomonas reinhardtii* und *Euglena gracilis*, Diplomarbeit, TU Darmstadt (2008).
- [51] Salvi, D., Rolland, N., Joyard, J. und Ferro, M., Purification and proteomic analysis of chloroplasts and their sub-organellar compartments, *Methods Mol. Biol.* **432**, 19–36 (2008).
- [52] Funes, S., Franzén, L.G. und González-Halphen, D., *Chlamydomonas reinhardtii*: the model of choice to study mitochondria from unicellular photosynthetic organisms, *Methods Mol. Biol.* **372**, 137–149 (2007).
- [53] Zerges, W. und Rochaix, J.D., Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Cell Biol.* **140**, 101–110 (1998).
- [54] Daum, B., Nicastro, D., Austin, J., McIntosh, J.R. und Kühlbrandt, W., Arrangement of photosystem II and ATP synthase in chloroplast membranes of spinach and pea, *Plant Cell* **22**, 1299–1312 (2010).
- [55] Kyle, D.J., Kuang, T.Y., Watson, J.L. und Arntzen, C.J., Movement of a sub-population of the light harvesting complex (LHCII) from grana to stroma lamellae as a consequence of its phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta* **765**, 89 – 96 (1984).
- [56] Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248 – 254 (1976).
- [57] Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, K. und Tokuda, K., Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex, manually and in a Hitachi 726 automated analyzer, *Clin. Chem.* **32**, 1551–1554 (1986).
- [58] Marshall, T., Abbott, N.J., Fox, P. und Williams, K.M., Protein concentration by precipitation with pyrogallol red prior to electrophoresis, *Electrophoresis* **16**, 28–31 (1995).
- [59] Lottspeich, F. und Engels, J.W., *Bioanalytik*, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München; Heidelberg, 2. Aufl. (2006).

-
- [60] Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* **227**, 680–5 (1970).
- [61] Rehm, H., *Der Experimentator; Proteinbiochemie/Proteomics*, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München, 5. Aufl. (2006).
- [62] Schägger, H., Cramer, W.A. und von Jagow, G., Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis, *Anal. Biochem.* **217**, 220–230 (1994).
- [63] Wittig, I., Karas, M. und Schägger, H., High resolution clear native electrophoresis for in-gel functional assays and fluorescence studies of membrane protein complexes, *Mol. Cell. Proteomics* **6**, 1215–1225 (2007).
- [64] Schägger, H. und von Jagow, G., Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal. Biochem.* **199**, 223–231 (1991).
- [65] Krause, F. und Seelert, H., Detection and analysis of protein-protein interactions of organellar and prokaryotic proteomes by blue native and colorless native gel electrophoresis, *Curr. Protoc. Protein Sci.* **Chapter 19**, Unit 19.18 (2008).
- [66] Poetsch, A., Neff, D., Seelert, H., Schägger, H. und Dencher, N.A., Dye removal, catalytic activity and 2D crystallization of chloroplast H⁺-ATP synthase purified by blue native electrophoresis, *Biochim. Biophys. Acta.* **1466**, 339–49 (2000).
- [67] Neff, D. und Dencher, N.A., Purification of multisubunit membrane protein complexes: isolation of chloroplast F₀F₁-ATP synthase, CF₀ and CF₁ by blue native electrophoresis, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **259**, 569–575 (1999).
- [68] Wittig, I. und Schägger, H., Advantages and limitations of clear-native PAGE, *Proteomics* **5**, 4338–4346 (2005).
- [69] Heidrich, N.G., Optimierungen zur Elution der Chloroplasten-F₀F₁-ATP-Synthase aus präparativen, farblos-nativen Polyacrylamidgelen, Diplomarbeit, TU Darmstadt (2007).
- [70] Righetti, P.G., Brost, B.C. und Snyder, R.S., On the limiting pore size of hydrophilic gels for electrophoresis and isoelectric focusing, *J. Biochem. Biophys. Methods* **4**, 347–363 (1981).
- [71] Seelert, H. und Krause, F., Preparative isolation of protein complexes and other bioparticles by elution from polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **29**, 2617–2636 (2008).
- [72] Yeh, S.T., Angelos, M.G. und Chen, Y.R., Simplified method for concentration of mitochondrial membrane protein complexes, *Electrophoresis* **31**, 1934–1936 (2010).
- [73] Sunderhaus, S., Eubel, H. und Braun, H.P., Two-dimensional blue native/blue native polyacrylamide gel electrophoresis for the characterization of mitochondrial protein complexes and supercomplexes, *Methods Mol. Biol.* **372**, 315–324 (2007).
- [74] Eubel, H., Braun, H.P. und Millar, A.H., Blue-native PAGE in plants: a tool in analysis of protein-protein interactions, *Plant Methods* **1**, 11 (2005).

-
- [75] Müller, T., Charakterisierung von Membranproteinkomplexen aus Thylakoiden, Diplomarbeit, TU Darmstadt (2005).
- [76] Frenzel, M., Altersabhängige Untersuchung des Proteoms von *Rattus norvegicus*, Diplomarbeit, TU Darmstadt (2006).
- [77] Ahn, T., Yim, S.K., Choi, H.I. und Yun, C.H., Polyacrylamide Gel Electrophoresis without a Stacking Gel: Use of Amino Acids as Electrolytes, *Anal. Biochem.* **291**, 300 – 303 (2001).
- [78] Schägger, H. und Pfeiffer, K., Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* **19**, 1777–1783 (2000).
- [79] Rexroth, S., zu Tittingdorf, J.M.W.M., Krause, F., Dencher, N.A. und Seelert, H., Thylakoid membrane at altered metabolic state: challenging the forgotten realms of the proteome, *Electrophoresis* **24**, 2814–2823 (2003).
- [80] Miller, I., Crawford, J. und Gianazza, E., Protein stains for proteomic applications: which, when, why?, *Proteomics* **6**, 5385–5408 (2006).
- [81] Blum, H., Beier, H. und Gross, H.J., Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, *Electrophoresis* **8**, 93–99 (1987).
- [82] Rabilloud, T., Carpentier, G. und Tarroux, P., Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite, *Electrophoresis* **9**, 288–291 (1988).
- [83] Choi, J.K., Tak, K.H., Jin, L.T., Hwang, S.Y., Kwon, T.I. und Yoo, G.S., Background-free, fast protein staining in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel using counterion dyes, zincon and ethyl violet, *Electrophoresis* **23**, 4053–4059 (2002).
- [84] Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F.M. und Schägger, H., Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines, *Electrophoresis* **28**, 3811–3820 (2007).
- [85] Grandier-Vazeille, X. und Guérin, M., Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes, *Anal. Biochem.* **242**, 248–254 (1996).
- [86] Efremov, R.G., Baradaran, R. und Sazanov, L.A., The architecture of respiratory complex I, *Nature* **465**, 441–445 (2010).
- [87] Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. und Jap, B.K., Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ Complex, *Science* **281**, 64–71 (1998).
- [88] Seligman, A.M., Karnovsky, M.J., Wasserkrug, H.L. und Hanker, J.S., Nondroplet ultrastructural demonstration of cytochrome oxidase activity with a polymerizing osmiophilic reagent, diaminobenzidine (DAB), *J. Cell Biol.* **38**, 1–14 (1968).
- [89] Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S., The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å, *Science* **272**, 1136–1144 (1996).

-
- [90] Suhai, T., Heidrich, N.G., Dencher, N.A. und Seelert, H., Highly sensitive detection of ATPase activity in native gels, *Electrophoresis* **30**, 3622–3625 (2009).
- [91] Watt, I.N., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W. und Walker, J.E., Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16823–16827 (2010).
- [92] Jung, C., Higgins, C.M. und Xu, Z., Measuring the quantity and activity of mitochondrial electron transport chain complexes in tissues of central nervous system using blue native polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* **286**, 214–223 (2000).
- [93] Kirby, D.M., Thorburn, D.R., Turnbull, D.M. und Taylor, R.W., Biochemical assays of respiratory chain complex activity, *Methods Cell Biol.* **80**, 93–119 (2007).
- [94] Schäfer, E., Biochemische und strukturelle Untersuchungen von Superkomplexen der Atmungskette und von F_0F_1 -ATP-Synthasen, Dissertation, TU Darmstadt (2006).
- [95] Haan, C. und Behrmann, I., A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background, *J. Immunol. Methods* **318**, 11–19 (2007).
- [96] Albrecht, S., Brandl, H. und Adam, W., Chemilumineszenz-Reaktionen. Anwendungen in der klinischen Chemie, Biochemie und Medizin, *Chem. unserer Zeit* **24**, 227–238 (1990).
- [97] Holtzhauer, M., *Biochemische Labormethoden*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl. (1995).
- [98] McGadey, J., A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase, *Histochem. Cell Biol.* **23**, 180–184 (1970).
- [99] Granvogl, B., Reisinger, V. und Eichacker, L.A., Mapping the proteome of thylakoid membranes by *de novo* sequencing of intermembrane peptide domains, *Proteomics* **6**, 3681–95 (2006).
- [100] Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press (1996).
- [101] Schwassmann, H.J., Rexroth, S., Seelert, H. und Dencher, N.A., Metabolism controls dimerization of the chloroplast F_0F_1 ATP synthase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *FEBS Lett.* **581**, 1391–1396 (2007).
- [102] Leif, H., Weidner, U., Berger, A., Spehr, V., Braun, M., van Heek, P., Friedrich, T., Ohnishi, T. und Weiss, H., *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I, *Biochem. Soc. Trans.* **21**, 998–1001 (1993).
- [103] Maul, J.E., Lilly, J.W., Cui, L., dePamphilis, C.W., Miller, W., Harris, E.H. und Stern, D.B., The *Chlamydomonas reinhardtii* Plastid Chromosome: Islands of Genes in a Sea of Repeats, *Plant Cell* **14**, 2659–2679 (2002).
- [104] Merchant, S.S., Prochnik, S.E., Vallon, O., Harris, E.H., Karpowicz, S.J., Witman, G.B., Terry, A., Salamov, A., Fritz-Laylin, L.K., Maréchal-Drouard, L., Marshall, W.F., Qu, L.H., Nelson, D.R., Sanderfoot, A.A., Spalding, M.H., Kapitonov, V.V., Ren, Q., Ferris, P., Lindquist, E., Shapiro, H., Lucas, S.M., Grimwood, J., Schmutz, J., Cardol, P., Cerutti, H., Chanfreau, G., Chen, C.L., Cognat, V.,

Croft, M.T., Dent, R., Dutcher, S., Fernández, E., Fukuzawa, H., González-Ballester, D., González-Halphen, D., Hallmann, A., Hanikenne, M., Hippler, M., Inwood, W., Jabbari, K., Kalanon, M., Kuras, R., Lefebvre, P.A., Lemaire, S.D., Lobanov, A.V., Lohr, M., Manuell, A., Meier, I., Mets, L., Mittag, M., Mittelmeier, T., Moroney, J.V., Moseley, J., Napoli, C., Nedelcu, A.M., Niyogi, K., Novoselov, S.V., Paulsen, I.T., Pazour, G., Purton, S., Ral, J.P., Riaño-Pachón, D.M., Riekhof, W., Rymarkus, L., Schroda, M., Stern, D., Umen, J., Willows, R., Wilson, N., Zimmer, S.L., Allmer, J., Balk, J., Bisova, K., Chen, C.J., Elias, M., Gendler, K., Hauser, C., Lamb, M.R., Ledford, H., Long, J.C., Minagawa, J., Page, M.D., Pan, J., Pootakham, W., Roje, S., Rose, A., Stahlberg, E., Terauchi, A.M., Yang, P., Ball, S., Bowler, C., Dieckmann, C.L., Gladyshev, V.N., Green, P., Jorgensen, R., Mayfield, S., Mueller-Roeber, B., Rajamani, S., Sayre, R.T., Brokstein, P., Dubchak, I., Goodstein, D., Hornick, L., Huang, Y.W., Jhaveri, J., Luo, Y., Martínez, D., Ngau, W.C.A., Otilar, B., Poliakov, A., Porter, A., Szaĵkowski, L., Werner, G., Zhou, K., Grigoriev, I.V., Rokhsar, D.S. und Grossman, A.R., The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions, *Science* **318**, 245–250 (2007).

- [105] Thilmany, S., Effekte des Alterns und der kurzzeitigen Kalorienrestriktion auf das mitochondriale Proteom der Rattenleber, Diplomarbeit, TU Darmstadt (2008).
- [106] Dudkina, N.V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E.J. und Braun, H.P., Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane, *FEBS Lett.* **579**, 5769–72 (2005).
- [107] Pertoft, H., Laurent, T.C., Låås, T. und Kågedal, L., Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll), *Anal. Biochem.* **88**, 271–282 (1978).
- [108] Borkhsenius, O.N., Mason, C.B. und Moroney, J.V., The Intracellular Localization of Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* **116**, 1585–1591 (1998).
- [109] Schwassmann, H.J., Analyse von Atmungskettenkomplexen aus Organellen von *Chlamydomonas reinhardtii* und *Rattus norvegicus*, Dissertation, TU Darmstadt (2010).
- [110] Schäfer, E., Dencher, N.A., Vonck, J. und Parcej, D.N., Three-dimensional structure of the respiratory chain supercomplex I₁III₂IV₁ from bovine heart mitochondria, *Biochemistry* **46**, 12579–12585 (2007).
- [111] Seelert, H., Dencher, N.A. und Müller, D.J., Fourteen protomers compose the oligomer III of the proton-rotor in spinach chloroplast ATP synthase, *J. Mol. Biol.* **333**, 337–344 (2003).
- [112] Eubel, H., Jansch, L. und Braun, H.P., New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II, *Plant Physiol.* **133**, 274–286 (2003).
- [113] Schäfer, E.R., Altersabhängige Proteomanalyse verschiedener Modellorganismen, Dissertation, TU Darmstadt, **noch nicht eingereichte Arbeit** (2011).

Nicolas G. Heidrich
Florianstraße 17
68623 Lampertheim

12. April 2011

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.



Nicolas G. Heidrich

Nicolas G. Heidrich
Florianstraße 17
68623 Lampertheim

12. April 2011

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.



Nicolas G. Heidrich

Lebenslauf

Name, Vornamen	Heidrich, Nicolas Georges
Adresse	Florianstraße 17 68623 Lampertheim
Geburtsdatum, -ort	15.02.1980 Pinneberg
Staatsangehörigkeit	deutsch, französisch
Familienstand	ledig

Promotion

05/2011	voraussichtlicher Abschluss der Promotion (Dr.-Ing)
04/2011	Abgabe der Dissertation
07/2007–04/2011	Praktischer Teil der Dissertation unter der Leitung von Prof. Dr. N.A. Dencher, Technische Universität Darmstadt im Fachgebiet Biochemie Titel der Dissertation: Superkomplexe aus Algen und Cyanobakterien – Isolierung, Charakterisierung und strukturelle Untersuchung

Studium

06/2007	Diplom (Dipl.-Ing.), Fachbereich Chemie, Technische Universität Darmstadt Titel der Diplomarbeit: Optimierungen zur Elution der Chloroplasten- F ₀ F ₁ -ATP-Synthase aus präparativen, farblos-nativen Polyacrylamidgelen
10/1999–12/2006	Chemie-Studium, Technische Universität Darmstadt, Darmstadt Schwerpunkt Biochemie

Wehrdienst/Zivildienst

	Freistellung vom Wehrdienst/Zivildienst
02/1998–02/2004	Verpflichtung zum Dienst im Katastrophenschutz, 2. LZ-R (Löschzug-Retten), Freiwillige Feuerwehr Lampertheim

Schulausbildung

06/1999	Abitur, Lessing-Gymnasium, Lampertheim, Leistungsfächer: Chemie, Französisch
07/1990–06/1999	Lessing-Gymnasium, Lampertheim
07/1986–06/1990	Grundschule, Pestalozzi-Schule, Lampertheim

Lampertheim, 12. April 2011

N. Heidrich